

Nachweis von enterotoxischen *Bacteroides fragilis* Stämmen aus
klinischen Materialien und molekulare Charakterisierung der
Bacteroides fragilis Pathogenitätsinsel

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Zaida Corinna Claros
geboren am 04.12.1977 in Berlin

angefertigt an:
der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig im Institut für
Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie
Direktor: Prof. Dr. med. Arne C. Rodloff

Betreuer: Prof Dr. med. Arne C. Rodloff

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrads vom: 27.04.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	4
1.1 Historische Beschreibung des Genus <i>Bacteroides</i> mit der Typ-Spezies <i>Bacteroides fragilis</i>	4
1.1.1 Phänotypische Charakteristika des Genus <i>Bacteroides</i>	4
1.1.2 Molekulare Charakteristika und Taxonomie	5
1.1.3 Die Spezies <i>Bacteroides fragilis</i>	8
1.1.4 Antibiotika-Resistenzen bei der Spezies <i>Bacteroides fragilis</i>	9
1.1.5 <i>Bacteroides fragilis</i> : Zwei DNA-Homologie-Gruppen / zwei PCR Fingerprint-Gruppen	11
1.1.6 Natürliche Habitate obligater Anaerobier	11
1.1.7 Klinische Bedeutung der Spezies <i>Bacteroides fragilis</i>	11
1.2 Enterotoxin positive <i>Bacteroides fragilis</i>	13
1.2.1 <i>Bacteroides fragilis</i> Enterotoxin (BFT) – Fragilysin	14
1.2.2 <i>Bacteroides fragilis</i> Pathogenitätsinsel (BfPAI)	16
1.3 Weitere Krankheitsbilder	19
1.3.1 Infektionen/Sepsis	19
1.3.2 Chronisch-entzündliche Darmerkrankung und kolorektale Tumorbildung	20
2 Aufgabenstellung	21
3 Material und Methoden	22
3.1 Stämme	22
3.1.1 Referenzstämme	22
3.1.2 Auswahl der Klinischen Stämme	22
3.1.2.1 Vergleichsstämme der Spezies <i>Bacteroides vulgatus</i> und <i>ovatus</i>	23
3.1.2.2 Blutkulturen – Invasive Stämme	23
3.1.2.3 Nicht-Blutkulturen – Nicht-invasive Stämme	23
3.2 Kulturtechnik	24
3.2.1 Nährmedien	24
3.2.1.1 Columbia-Blut-Agar	24
3.2.2 Inkubation der anaeroben Kulturen	25
3.3 Gruppendifferenzierung der Isolate	25
3.3.1 Koloniemorphologie	25

3.3.2	Zellmorphologie – Gramfärbung	25
3.3.3	Differenzierung mittels Blättchentest.....	26
3.3.4	Biochemische Leistungsprüfung	26
3.4	Molekularbiologische Analysen.....	26
3.4.1	DNA-Extraktion.....	26
3.4.2	PCR-Reaktionsansätze.....	28
3.4.2.1	Optimierung der PCR-Ansätze nach Taguchi	29
3.4.3	PCR-Bedingungen	29
3.4.4	PCR-Fingerprint-Technik	30
3.4.4.1	Primer	30
3.4.4.2	PCR-Protokoll für T3B	31
3.4.4.3	Cycler-Profil.....	31
3.4.5	Spezifische PCR zum Nachweis von Teilen der BfPAI	32
3.4.5.1	Primer	32
3.4.5.2	PCR-Protokolle.....	32
3.4.5.3	Cycler-Profile	34
3.4.6	Agarose-Gel-Elektrophorese	35
3.4.7	Auswertung der Ergebnisse	36
3.5	Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	36
4	Ergebnisse	39
4.1	Identifizierung mittels phänotypischer Eigenschaften der Spezies <i>Bacteroides fragilis</i> Zell- und Koloniemorphologie.....	39
4.2	Biochemische Identifizierung.....	41
4.3	Molekulare Untersuchungen	42
4.3.1	Bestätigung der Spezies-Identifizierung mittels der PCR-Fingerprint- Technik	42
4.3.2	Unterteilung der Spezies in zwei PCR-Fingerprint-Gruppen	42
4.4	Nachweis von Enterotoxin und der BfPAI.....	44
4.4.1	Ergebnisse der PCR-Optimierung nach Cobb BD & Clarkson JM, 1994	44
4.4.2	Nachweis von Enterotoxin codierenden-Genabschnitten als Teile der BfPAI mittels dreier Primerpaare	45
4.4.3	PCR-Analyse der Schnittstellen der BfPAI unter Verwendung von zwei Primerpaaren.....	47
4.4.4	Auswertung der Blutkulturisolate.....	50
4.4.5	Nicht-Blutkulturen	53

4.4.6	Statistik zum Vergleich des Vorkommens der ETBF-Gen-Sequenzen und flankierenden Regionen (flanking regions) bei Blutkultur-Isolaten gegenüber Nicht- Blutkulturisolaten	61
4.4.7	Ausschluß von Enterotoxin-Genen bei <i>Bacteroides vulgatus</i> und <i>Bacteroides ovatus</i>	62
4.4.8	Vergleich der <i>Bacteroides fragilis</i> Stämme nach geographischer Herkunft.....	63
4.5	Sequenzierung der BfPAI-flankierenden Regionen in ausgewählten Stämmen	64
4.5.1	Sequenzierung der flankierenden Regionen	64
5	Diskussion	68
6	Zusammenfassung der Arbeit.....	79
7	Literaturverzeichnis	81
8	Anlagen.....	95
9	Danksagung	103
10	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	104
11	Publikationsliste	105

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A. dest.	Aqua destillata
Abb.	Abbildung
Abdominal-Flüss.	Abdominalflüssigkeit
Absz.	Abszess/Abszedierung
App.	Appendix
ATCC	American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA
BBE	<i>Bacteroides</i> Bile Esculin Agar
BfPAI	<i>Bacteroides fragilis</i> Pathogenitätsinsel
BFT	<i>Bacteroides fragilis</i> (Enterotoxin) Toxin
<i>bft</i>	<i>Bacteroides fragilis</i> Toxin Gen
BK	Blutkultur
bp	Basenpaare
CBA	Columbia Blood Agar
chron.	Chronisch
CO ₂	Kohlendioxid
Coccygeus-Abs.	Coccygeus-Abszess
Colon CA	Colon Carcinom
CTn	Transposon
d	Tage
D	Deutschland
Diab./Diabet.	Diabetes mellitus, diabetisch
dNTP	Nukleotide, zB dATP
ETBF	Enterotoxin positive <i>B. fragilis</i>
F	Frankreich
Fa.	Firma
Fpn	Fragipain (Protease)
g	Gramm
GALT	Darm assoziiertes lymphatisches Gewebe
h	Stunde

Herz-OP, atyp.Pneu	Herz-Operation, Atypische Pneumonie
IMB	Institut für Mikrobiologie Infektionsimmunologie Berlin
IML	Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie der Universität Leipzig
infiz.	infiziert
KA	Keine Angabe eruierbar
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität (München)
LOY	Loyola Universität (Chicago)
LPS	Lipopolysaccharid
LRJ	Institut für Mikrobiologie Jena
MALDI-TOF	Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) mit der Flugzeitanalyse (engl. time of flight) TOF
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
<i>mpII</i>	Metalloprotease Gen II
MPII	Zink-Metalloprotease II
Narbenabsz.	Narbenabszess
NBK	Nicht-Blutkultur, Probe stammt aus einer anderen Quelle als Blut
neg	Negativ
NTBF	Nicht Enterotoxin bildende <i>B. fragilis</i>
OMPs	Outer membrane proteins
PBP	Penicillin-Bindungs-Proteine
PCR	Polymerase chain reaction
Perf. Appendix	Perforierter Appendix/Appendicitis
Perf. Sigma-Divertik.	Perforierte Sigmadivertikulitis
pos	Positiv
R.D.Tibia	Rechter Tibia-Knochen
Re. Fuss Ulcer	Rechter Fuß Ulzeration
Re. Groin	Rechte Leiste
Rez.Abs.Abd., HPV	Rezidivierende Abszesse Abdomen, HPV humanes Papillomavirus
RMA	Rosemary Alden Research Laboratories (Santa Monica)

s	Sekunde
sek.heilende Epi- Naht	Sekundär heilende Naht (epithelisiert)
T3B	t-DNA-Primer
Tab.	Tabelle
VPI	Virginia Polytechnical Institute (USA)

1 Einleitung

In den vergangen 15 bis 20 Jahren sind mit umfangreichen molekularen Untersuchungen des humanen Mikrobioms und der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *Bacteroides fragilis* (Cerdeño-Tárraga AM et al., 2005) viele Eigenschaften und Funktionen dieser Spezies aufgeklärt worden. Details aus der klinischen Praxis, wie das häufige Vorkommen von *B. fragilis* in klinischen Proben (Goldstein EJC, 1995), wurden mittels wissenschaftlicher Untersuchungen belegt. Damit ist die Wahrnehmung der klinischen Bedeutung von *B. fragilis* als Verursacher lebensbedrohlicher Infektionskrankheiten gestiegen. Eine Schlüssel-Entdeckung, wie die des *Bacteroides fragilis*-Enterotoxins (Myers LL, 1986) sowie die Entwicklung von Resistenzen gegenüber häufig gebrauchten Antibiotika, besonders Beta-Lactam-Antibiotika in Kombination mit Beta-Lactamase-Hemmern haben *B. fragilis* als Infektionserreger in ein neues Licht gerückt (Brook I et al., 2013).

1.1 Historische Beschreibung des Genus *Bacteroides* mit der Typ-Spezies *Bacteroides fragilis*

1.1.1 Phänotypische Charakteristika des Genus *Bacteroides*

Das Genus *Bacteroides* umfasst stäbchenförmige, gramnegative Zellen mit gerundeten Enden, welche einzeln oder in Paaren liegend vorkommen. Die Zellen sind ca. 0.5–2.0µm breit und 1.6–12µm lang. Zellpräparate von jungen Kulturen (Wachstum auf CBA, 48h) stellen sich relativ gleichförmig dar. Wachsen Kulturen auf anderen Medien oder werden Zellen älterer Kulturen gefärbt, können diese auch pleomorph oder mit Vakuolen auftreten. *Bacteroides* Zellen sind unbeweglich und wachsen unter anaeroben Bedingungen. Die Kolonien sind bei Wachstum auf Blutagar glatt, rund, konvex, weiß bis grau, nicht hämolytisch und haben einen Durchmesser von 1–3mm. Ihre biochemischen Eigenschaften sind chemoorganotrophisch,

saccharolytisch und schwach proteolytisch. *Bacteroides* Spezies sind Galle resistent. Äskulin wird hydrolysiert aber Nitrat wird nicht zu Nitrit reduziert. Die Indol-Produktion ist variabel. Fermentationsprodukte sind Succinat und Acetat und mittlere Mengen Isobutyrat sowie Isovalerat können produziert werden. Die dominierende langkettige Fettsäure ist anteiso-C15:0.



Abb. 1: *B. fragilis* (RM Alden Research Lab, zu Verfügung gestellt durch Diane Citron).

1.1.2 Molekulare Charakteristika und Taxonomie

Die Klassifizierung von Spezies bzw. Genera wird seit einigen Dekaden kontinuierlich angepasst. Wie in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1. Edition, (Holdemann LV et al., 1984) beschrieben, umfasste das Genus *Bacteroides* ursprünglich mehr als 60 Spezies. Diese zeigten eine einheitliche Morphologie, waren jedoch biochemisch und phylogenetisch extrem heterogen. Erste repräsentative molekulare Charakterisierungen einer repräsentativen Anzahl von klinischen Isolaten des Genus *Bacteroides* wurden zwischen 1976 und 1986 mit Hilfe von DNA- und RNA-Homologieuntersuchungen von

Cato EP und Johnson JL (1976) sowie Johnson JL und Harich B (1986) vorgenommen. Unter Anderem beschrieben Johnson und Ault 1978 (Johnson JL & Ault DA, 1978) zwei DNA-Homologiegruppen der Spezies *B. fragilis*, welche 1986 von Johnson und Harich mit Hilfe von RNA-Homologieuntersuchungen bestätigt wurden. Shah und Collins reklassifizierten im Jahr 1989 das Genus und ordneten ihm zehn Spezies zu. Das Genus umfasste die in der klinischen Routine als „*Bacteroides fragilis* Gruppe“ (formal keine taxonomische Gruppe, beinhaltete aber die zehn Spezies, welche 1989 dem Genus zugeordnet waren) bezeichneten Spezies. DNA-DNA Hybridisierungen und 16S rRNA Gen-Sequenzierungen haben hauptsächlich dazu beigetragen, inter- und intragenetische Strukturen des Genus *Bacteroides* aufzuklären. 16S rRNA Sequenz-Analysen zeigten, dass das Genus *Bacteroides* äquivalent ist zu dem *Bacteroides* Cluster in der *Bacteroides* Subgruppe der „*Bacteroidetes*“ (vormals beschrieben als *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* Phylum).

In den letzten 15 Jahren unterlag das Genus wiederum umfangreichen Revisionen. Der Einsatz von PCR- und Sequenzierungs-Techniken, wie der 16S rDNA Gen Sequenzierung, führte sowohl zu der Beschreibung neuer Spezies (wie z.B. *Bacteroides goldsteinii* und *Bacteroides nordii* (Song Y et al., 2004, 2005) als auch zur Re-Klassifizierung von Spezies und Genera wie *Parabacteroides* (Paster BJ et al., 1994; Sakamoto M et al., 2015). Derzeit umfasst das Genus *Bacteroides* mehr als 20 Spezies. Das Genus *Parabacteroides* enthält hingegen bisher nur einige Spezies. Ein Teil dieser Spezies wurden als Einzel-Stämme aus humanem Stuhl isoliert und mit molekularen Methoden beschrieben.

Tab. 1: *Bacteroides* und *Parabacteroides* spp. (*Bacteroides fragilis* Gruppe) nach Brook I et al., 2013.

Genus	Spezies
<i>Bacteroides</i>	
	<i>acidifaciens</i>
	<i>caccae</i>
	<i>coprocola</i>
	<i>coprosuis</i>
	<i>eggerthii</i>
	<i>finegoldii</i>
	<i>fragilis</i>
	<i>helcogenes</i>
	<i>intestinales</i>
	<i>massiliensis</i>
	<i>nordii</i>
	<i>ovatus</i>
	<i>thetaiotaomircon</i>
	<i>vulgatus</i>
	<i>plebeius</i>
	<i>uniformis</i>
	<i>salyersai</i>
	<i>pyogenes</i>
	<i>dorei</i>
	<i>johnsonii</i>
<i>Parabacteroides</i>	
	<i>distasonis</i>
	<i>merdae</i>
	<i>goldsteinii</i>
	<i>chartae</i>
	<i>gordonii</i>
	<i>johnsonii</i>

1.1.3 Die Spezies *Bacteroides fragilis*

Bei der Spezies *Bacteroides fragilis*, welche als Typspezies dem Genus *Bacteroides* und der Familie der *Bacteroidaceae* angehört, handelt es sich um gramnegative, nicht Sporen-bildende obligat anaerobe Bakterien.

Die Spezies weist einen mol% G+C DNA-Gehalt von 39–49 auf. Die Zelloberfläche von *B. fragilis* ist komplex und besteht aus einer mehr oder weniger ausgeprägten Polysaccharidkapsel, dem Lipopolysaccharid (LPS) und den Oberflächen-assoziierten Proteinen (z.B. der Neuraminidase). Die Kapsel, als einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *B. fragilis* angesehen, ist komplex aufgebaut. Es wurden mehrere Kapseltypen von *B. fragilis* beschrieben, welche strukturelle und Antigen-Varianten aufweisen. Diese Kapsel initiiert eine spezielle Immunantwort im Wirt: die Abszessbildung. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl bakterielle Mischpopulationen als auch *B. fragilis* als Einzelorganismus in der Lage sind, Abszesse zu bilden (Onderdonk AB et al., 1990; Tzianabos AO et al., 1995; Tzianabos AO et al., 1995; Kalka-Moll WM et al., 2001) und sich im Körper auszubreiten. Delahooke DM et al. zeigten 1995, dass das LPS von *B. fragilis* biologisch aktiv ist. Allerdings ist sowohl die biologische Aktivität als auch die chemische Zusammensetzung des LPS von der Extraktionsmethode abhängig. In Tier-experimentellen Mischinfektionen wurden synergistische Effekte zwischen fakultativen Aerobiern und Anaerobiern gezeigt (Rodloff AC & Hahn H, 1984; Rodloff AC, 1987). Die Außenmembranproteine (OMPs) sind innerhalb der Spezies *B. fragilis* sowohl als Spezies – als auch als Subspezies-spezifisch anzusehen. Es wurden diverse Membranproteine identifiziert und außerdem gezeigt, dass es sich bei OmpA um ein wichtiges Außenmembranprotein sowie einen Virulenzfaktor handelt (Wexler HM, 2012). Als weitere Virulenzfaktoren wurden neben der Adhärenz an spezifische Epithelien, die Enzyymbildung u.a. Neuraminidase (Fraser AG & Brown R, 1981), DNase, Hyaluronidase, Chondroitin-

sulfatase (Rudek W & Haque RU, 1976) und die Enterotoxinbildung (Zhang G et al., 1999; Sears CL, 2001) identifiziert.

Zur phänotypischen Identifizierung von *B. fragilis* wurde die Erstellung des biochemischen Profils genutzt: Die Spezies ist Galle-resistent (20% Galle), Indol-negativ, Äskulin-positiv und Katalase-positiv (Rocha ER & Smith CJ, 1995), wobei die ausgeprägte Katalase-Bildung für die Sauerstofftoleranz von *B. fragilis*, besonders bei klinischen Isolaten, verantwortlich ist (Bergan T, 1984). Des Weiteren sind die Stämme dieser Spezies nicht in der Lage Arabinose, Trehalose oder Rhamnose zu verwerten. Im Allgemeinen erfolgt die Zuordnung von klinischen Isolaten zum Genus *Bacteroides* durch die mikroskopische Darstellung und die Begutachtung der Koloniemorphologie sowie durch die Bewertung der charakteristischen Muster der Antibiotika-Disks (Vancomycin 5µg, Kanamycin 100µg, Colistin 10µg). Die Differenzierung der *B. fragilis* Isolate von anderen *Bacteroides* Spezies kann über den Einsatz von Schlüsselreaktionen wie Galle-Resistenz und Indol-Produktion nach den von Citron DM et al., 1990 veröffentlichten Schemata erfolgen. Weiterhin wird seit einigen Jahren in der klinischen Routine die MALDI-TOF-Technik (Karas D et al., 1985) zur Identifizierung im Prozess der Routinediagnostik von Anaerobiern genutzt. Die Identifizierungsergebnisse sind aber aufgrund unvollständiger Datenbanken für Anaerobier limitiert (Rodríguez-Sánchez B et al., 2016).

1.1.4 Antibiotika-Resistenzen bei der Spezies *Bacteroides fragilis*

Bacteroides Spezies zeigen Resistenzen gegenüber diversen Chemotherapeutika-Klassen (Smith CJ, 2002). Klinische Isolate weisen immer häufiger Resistenzen gegenüber unterschiedlichsten Beta-Lactam-Antibiotika auf. In den letzten Jahren wurden zunehmend Resistenzen gegenüber Breitspektrum-Cephalosporinen (einschließlich Cefoxitin) und Clindamycin (Brook I et al., 2013; Wexler HM & Finegold SM, 1998) sowie Chinolon-Resistenzen nachge-

wiesen. Agenzien wie Metronidazol und Carbapeneme sind meist aktiv gegenüber *B. fragilis*. Dies trifft ebenfalls bei 95–99% der Stämme auf Beta-Lactam / Beta-Lactamase-Inhibitor Kombinationen zu. Entgegen dieser im Allgemeinen weiterhin positiven Prognose der Resistenzsituation gibt es eine zunehmende Anzahl von phänotypischen Resistenzen sowie einen graduellen Anstieg der MHK-Werte. Weiterhin wurde durch Multicenter-Studien weltweit belegt, dass ein Anstieg der Resistenzraten innerhalb des Genus *Bacteroides* auftritt (Snydman DR et al., 2002 und 2007). Multiresistente Stämme, welche in der Lage sind, spezielle Resistenzgene zu übertragen, wurden in Entwicklungsländern sowie in den USA, England, Spanien und Frankreich isoliert (Breuil J et al, 1989).

Zur Resistenzentwicklung gegenüber Beta-Lactam-Antibiotika sind die wichtigsten Mechanismen die Produktion von Beta-Lactamasen, die Veränderungen der Penicillin-Bindungs-Proteine (PBP) und die Abnahme der Außenmembran-Permeabilität gegenüber den Beta-Lactam-Antibiotika. Resistenz gegenüber Clindamycin wird durch die Modifikation des Ribosoms vermittelt. Tetrazyklin-Resistenz wird sowohl durch einen Tetrazyklin-Efflux als auch durch Schutz des Ribosoms erreicht. Metronidazol-Resistenz wird hingegen durch die Kombination einer verminderten Antibiotika-Aufnahme und einer verminderten Nitroreductase-Aktivität erreicht (Fang H et al., 2002). Für die Chinolonresistenz gibt es zwei Hauptmechanismen, erstens die Änderung des Target-Enzymes (Gyrase), hervorgerufen durch chromosomale Mutation der codierenden Gene und zweitens eine reduzierte intrazelluläre Akkumulation des Antibiotikums durch einen gesteigerten Efflux (Oh H & Edlund C, 2003).

1.1.5 *Bacteroides fragilis*: Zwei DNA-Homologie-Gruppen / zwei PCR Fingerprint-Gruppen

Erstmals wurden von Johnson JL et al. (1978) zwei DNA-Homologie-Gruppen innerhalb der Spezies *B. fragilis*, allerdings ohne Zuordnung phänotypischer Merkmale, beschrieben. 1986 demonstrierten Appelbaum PC et al. anhand von zehn Stämmen den Zusammenhang zwischen der von Johnson JL (1978) beschriebenen DNA-Homologie-Gruppe II und einem abweichenden Resistenzmuster gegenüber Breitspektrum- β -Lactam-Antibiotika. Die Mehrzahl der Stämme innerhalb der Studie war Carbapenem-sensibel, eine sehr kleine Stammzahl war Carbapenem intermediär resistent bzw. resistent.

1.1.6 Natürliche Habitate obligater Anaerobier

Bakterien spielen eine wichtige Rolle bei allen menschlichen Körperfunktionen. Die humane Flora besteht zu einem großen Teil aus anaeroben Bakterien. Von obligat anaeroben Bakterien besiedelt sind vor allem der Oropharyngealtrakt mit den Genera *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* sowie grampositiven Kokken, der weibliche Genitaltrakt mit *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Bacteroides* Spezies. Im Dickdarm finden sich die Genera *Bacteroides*, *Clostridium*, *Prevotella*, *Eubacterium* in erheblich größerer Anzahl als fakultativ aerobe Keime, wie z.B. *Escherichia coli*. *B. fragilis* gehört zur humanen Darmflora und macht etwa 0.5% der normalen Dickdarmflora aus (Dorsher CW et al., 1991; Moore WE & Holdeman LV, 1974). Sie wurden ebenfalls, allerdings in geringerer Zahl, im weiblichen Genitaltrakt nachgewiesen, treten als Normalflora aber nicht in der Mundhöhle oder im oberen Respirationstrakt auf (Finegold SM, 1996).

1.1.7 Klinische Bedeutung der Spezies *Bacteroides fragilis*

Der Anteil von *Bacteroides* spp. an anaeroben Infektionen (Abb. 2) wurde aus der Wadsworth Collections Datenbank (Wexler HM, 2007) mit über 3000 klini-

schen Isolaten ermittelt. Die Zahl der *B. fragilis* Isolate aus der normalen Darmflora war 10 – 100fach geringer als die anderer intestinaler *Bacteroides* spp. Trotzdem wurde *B. fragilis* am häufigsten aus klinischen Untersuchungsmaterialien isoliert. Dies gilt auch für aerob-anaeroben Mischinfektionen mit *Enterobacteriales* z.B. bei intraabdominalen eitrigen Prozessen wie Peritonitis oder perforierte und gangränöse Appendizitis (Wexler HM, 2007).

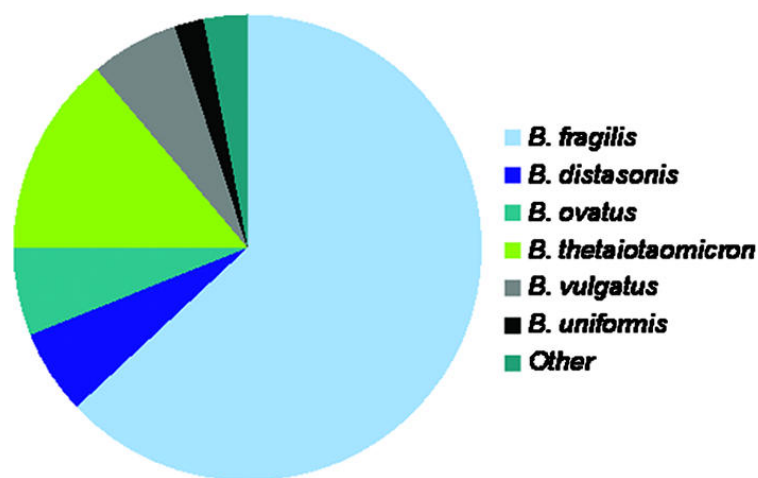


Abb. 2: Isolationshäufigkeit von *Bacteroides* spp. aus klinischen Materialien (Wexler HM, 2007).

Obwohl nicht Teil der normalen Vaginalflora, wurde *B. fragilis* als Erreger gynäkologischer Infektionen, wie Vaginitis und Zervicitis gefunden. Im Ausnahmefall wurden bei unterschiedlichen klinischen Bildern auch Enterotoxin positive *B. fragilis* (ETBF) nachgewiesen (Leszczynski P et al., 1997). Bei weiteren Infektionen wurde eine Verbindung zu Abszessbildung (z.B. Infektionen des kleinen Beckens) beschrieben (Dorsher CW et al., 1991; Polk BF & Kasper DL, 1977; Brook I et al., 2013). Bei Infektionen des Kopf-Hals-Bereiches, speziell bei Prozessen des Mittelohrs oder des Mastoids mit lokaler Ausbreitung zum Temporallappen war *B. fragilis* präsent (Ingham HR et al., 1977) und auch als Einzelerreger ätiologisch verantwortlich.

Sehr selten kann *B. fragilis* als Erreger von Endokarditiden, Septischer Arthritis, Osteomyelitiden sowie Device-assoziierten Infektionen vorkommen (Finegold SM, 1989).

Generell können endogene Infektionen mit *B. fragilis* im gesamten Körper auftreten. Aufgrund seiner Fähigkeit zur Adhärenz an spezifische Gewebe besiedelt *B. fragilis* häufiger als z.B. *B. thetaiotaomicron* die Schleimhäute und verursacht in deren Nähe Infektionen. Neben dieser Fähigkeit stellt die Abszessbildung ein Charakteristikum von *B. fragilis* dar, somit können *B. fragilis* Isolate z.B. in Abszessen der Mundhöhle isoliert werden. Aber auch in Sepsisfällen stellen *B. fragilis* die am meisten nachgewiesenen anaeroben Organismen dar. Eine erhöhte Morbidität und Letalität ist beschrieben (Dorsher CW et al., 1991; Redondo MC et al., 1995; Nguyen MH et al., 2000). Obwohl die Standortflora sehr viele unterschiedliche obligat anaerobe Spezies umfasst, stellen hauptsächlich Vertreter des Genus *Bacteroides* neben einigen wichtigen Vertretern des Genus *Clostridium* Keime dar, welche auch als Einzelerreger schwer zu therapierende Infektionen hervorrufen.

1.2 Enterotoxin positive *Bacteroides fragilis*

Zum ersten Mal wurde die mögliche Enterotoxizität von bestimmten *B. fragilis* Stämmen im Zusammenhang mit Durchfallerkrankungen bei Lämmern diskutiert (Myers LL et al., 1984). In Versuchen mit ligierten Darmabschnitten von Lämmern wurde festgestellt, dass ETBF im Gegensatz zu Enterotoxin negativen (NTBF) Stämmen eine sekretorische Reaktion hervorrufen. Als Ursache wurde ein 20 kDa Toxin (*B. fragilis* Toxin = BFT = Fragilysin) identifiziert, welches von einigen *B. fragilis* Isolaten sezerniert wird. Ähnliche Ergebnisse wurden bei Kälbern, Fohlen, Ferkeln sowie bei Ratten und Kaninchen festgestellt (Myers LL et al., 1985; Obiso RJ Jr et al., 1995; Sears CL et al., 1995; Myers LL et al., 1987, 1989).

In zahlreichen Studien wurde bisher eine Assoziation von ETBF und Durchfallerkrankungen bei Menschen (Merino VRC et al., 2011) nachgewiesen. Besonders betroffen waren Kleinkinder, die älter als ein Jahr waren (Sack RB et al., 1992, 1994; San Joaquin VH et al., 1995; Cáceres M et al., 2000; Kato N et al., 1999; Menozzi MG et al., 1998; Pantosti A et al., 1997; Vu Nguyen T et al., 2005) und Erwachsene über Sechzig (Zhang G et al., 1999). Aus diesen Studien, welche sowohl in Industriestaaten als auch in Entwicklungsländern durchgeführt wurden, lässt sich auf *B. fragilis* als weltweit bedeutendes Darmpathogen schließen (Sears CL, 2001).

1.2.1 *Bacteroides fragilis* Enterotoxin (BFT) – Fragilysin

Bei dem *B. fragilis* Enterotoxin handelt es sich um eine Metalloprotease (Moncrief JS et al., 1995).

Das BFT verursacht beim Menschen und auch bei allen bisher untersuchten Tier-Spezies eine dosisabhängige Flüssigkeitssekretion in das Lumen von Dünn- und Dickdarm, wobei das Sekret mit Natrium, Chlorid, Albumin und Protein angereichert ist. Nach höheren Toxindosen wurden auch hämorrhagische Flüssigkeit und Schleimhautblutungen gefunden (Myers LL et al., 1987; Kay BA et al., 1990), wodurch die Hypothese, dass BFT eine intestinale Entzündungsreaktion hervorruft, unterstützt wird.

Der Nachweis der biologischen Aktivität des BFT erfolgte erstmals 1992 durch Weikel CS et al. mit Hilfe von in-vitro-Verfahren, in welchen bei der Behandlung klonierter HT29/C1-Zellen (einer humanen enteralen Karzinomzelllinie) mit BFT morphologische Veränderungen beobachtet wurden. Der größte Effekt zeigte sich, wenn BFT auf basolaterale Membranen von polarisierten Epithelzellen, insbesondere von Zellen, welche die Zonula occludens (Tight junctions) bilden, gebracht wurde (Chambers FG et al., 1997; Obiso RJ Jr et al., 1997). Das BFT beeinflusst nach Aktivierung durch

eine Protease fragipain (Fpn) (Choi VM et al., 2016; Herrou J et al., 2016) die Zonula occludens und die Zonula adherens, welche zusammen den Tight Junction Complex bilden, negativ (Abb. 3). In diesem Zusammenhang fanden Wells CL et al., 1996 heraus, dass BFT das Hauptprotein der Zonula adherens, E-cadherin, schneidet. Des Weiteren ist es in der Lage, auf die F (filamententöses)-Aktin-Struktur einzuwirken (Donelli G et al., 1996; Koshy SS et al., 1996; Saidi RF et al., 1997; Chambers FG et al., 1997).

Es verändert Oberflächenproteine, wie Fibrinogen, Komplement C3, zytoskeletale und extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagen IV durch Proteolyse und beeinflusst die Zellfunktion, ohne in die Zellen eintreten zu müssen (Saidi RF & Sears CL, 1996; Obiso RJ Jr et al., 1997). Durch das BFT hervorgerufene morphologische Veränderungen in der Zelle sind innerhalb weniger Minuten feststellbar (Saidi RF & Sears CL, 1996). Ein Zelltod durch Apoptose, auch bei niedrigen Toxinkonzentrationen, kann innerhalb von 48h beobachtet werden. Einen weiteren Effekt des BFT stellt die Sekretion von IL-8 und TGF- β aus epithelialen Zellen dar (Sanfilippo L et al., 2000).

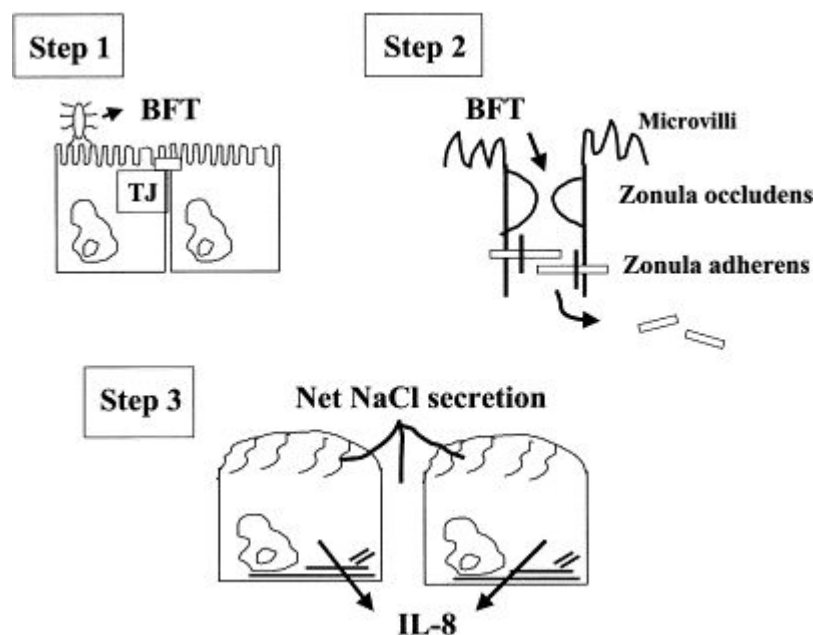


Abb. 3: Nach Sears CL, 2001. Negative Beeinflussung der Tight junction durch das BFT-Fragilysin.

1.2.2 *Bacteroides fragilis* Pathogenitätsinsel (BfPAI)

In Studien (Lee CA, 1996; Hacker J et al., 1997) wurde auf die Existenz von Pathogenitätsinseln in Bakterien hingewiesen. Das sind DNA-Segmente, in welchen mehrere Virulenz-Gene bakterieller Pathogene lokalisiert sind. Diese Pathogenitätsinseln sind durch die Anwesenheit von mehr als einem Virulenz-Gen und von einem GC-Gehalt, der sich vom GC-Gehalt des Wirtsbakteriums unterscheidet, charakterisiert. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Pathogenitätsinseln als fremde DNA in das Wirtschromosom integriert werden, und zwar speziell an Orten, die besonders wichtig für die DNA-Rekombination sind (McDaniel TK et al., 1995).

Franco AA und Kollegen fanden 1999 eine 6-kb-Region (6,036bp) innerhalb der *B. fragilis*-DNA, welche später als *Bacteroides fragilis* Pathogenitätsinsel (BfPAI) identifiziert wurde. In dieser Region befindet sich das Gen *bft-2*. Sie konnten drei verschiedene genetische *B. fragilis*-Populationen definieren: Zum ersten ETBF Stämme, die als einzige die 6-kb-Region besitzen, aber auch dazugehörige flankierende DNA-Regionen (**Pattern I**). Zweitens NTBF Stämme, welche weder die 6-kb-Region noch die flankierenden Regionen besitzen (**Pattern II**) und als dritte Gruppe NTBF Stämme, die nicht die 6-kb-Region besitzen, jedoch die flankierende DNA (**Pattern III**). Für die Allele *bft-1* und *bft-3* fanden sich ähnliche Ergebnisse (Moncrief JS et al., 1998). Das pathogene Potential der NTBF Stämme des Pattern III mit den flankierenden genetischen Regionen (ca. 12kb) ist bisher unklar.

Bei weiterer Untersuchung der 6-kb-Region fanden die Untersucher eine 1180bp-Sequenz, die für ein 44.36 kD-Protein, eine Zink-Metalloprotease (MPII) codiert (Moncrief JS et al., 1998). Dieses Protein, welches dem BFT zu ca. 30% ähnelt und zusätzlich eine ATP/GTP-Bindungsstelle besitzt, konnte bisher weder in seiner biologischen Aktivität noch in seiner Rolle als ETBF-

Pathogenitätsfaktor aufgeklärt werden (Franco AA et al., 1999, 2002). Es wurde jedoch herausgefunden, dass die Gene *bft* und *mpII* co-lokalisiert sind (Abb. 5).

Der GC-Gehalt der 6-kb-Region (35%) unterscheidet sich deutlich von dem des *B. fragilis* Chromosoms (42%). Man geht also davon aus, dass die Kriterien einer Pathogenitätsinsel durch das Vorhandensein der *bft*- und *mpII*-Gene und des abweichenden GC-Gehalts erfüllt werden. Des Weiteren besitzen auch die die BfPAI flankierenden DNA-Segmente einen erhöhten GC-Gehalt, die linke Flanke 47% und die rechte 50%. Die flankierende DNA hat somit einen signifikant erhöhten GC-Gehalt im Vergleich zum Chromosom und zur BfPAI (Abb. 4) (Franco AA et al., 1999).

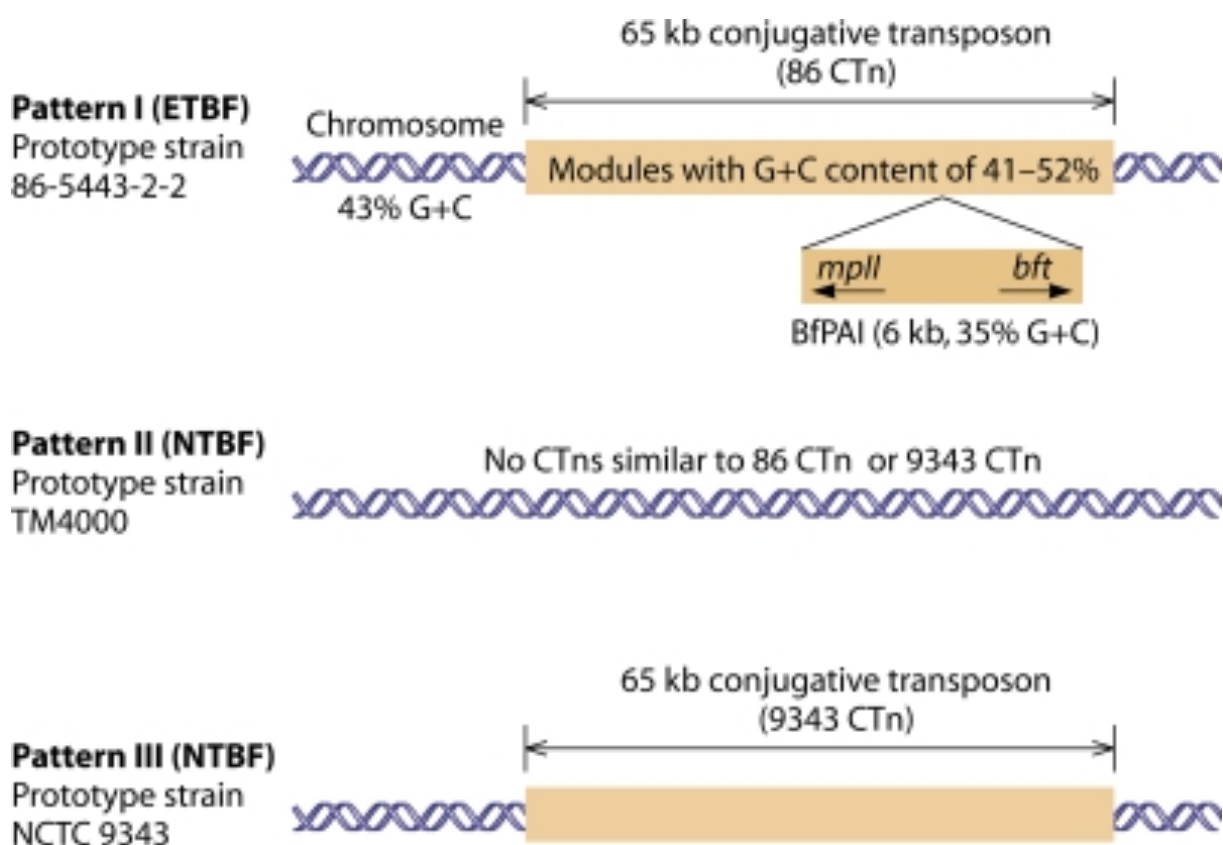


Abb. 4: Nach Sears CL, 2009. Schematische Darstellung der molekularen Typen von *B. fragilis*. Pattern I sind ETBF Stämme, welche mindestens ein 65-kb Transposon (86 CTn) besitzen; innerhalb diesem befindet sich die 6-kb BfPAI. Diese besitzt zwei Gene, eines codiert BFT (*bft*) und ist wichtig für die Pathogenität von ETBF. Das andere codiert eine Metalloprotease (*mpII*), ein Virulenzprotein. Pattern II *B. fragilis* Stämmen fehlt CTn86 und CTn 9343 (oder verwandte Sequenzen). Pattern III *B. fragilis* Stämme sind NTBF Stämme, welche mindestens ein 65-kb Transposon (9343 CTn) tragen.

Links der BfPAI wurde eine Region gefunden, welche die gleiche Organisation wie die Mobilisierungsregion des 5-Nitro-Imidazol- und Clindamycin-Resistenz-Plasmids von *B. vulgatus* und *B. fragilis* zeigte (Franco AA et al., 1999). Diese Region besitzt die beiden *B. fragilis* Mobilisierungsgene A und B (*bfm A* und *bfm B*). Zu deren Linken liegen Strukturen, die dem „Origin of Transfer“ (*oriT*) von konjugierbaren oder mobilisierbaren Plasmiden gleichen.

Rechts der BfPAI liegt das *bfm C*, welches signifikante Homologie zu den Mobilisierungsgenen einiger Nicht-*Bacteroides* Spezies aufweist. Die BfPAI liegt zwischen den Stop-Codons von *bfm B* und *C* und ist sowohl in ihrer Lokalisation als auch in ihrer Richtung festgelegt.

Somit liegt die Vermutung nahe, dass die BfPAI in einem beweglichen genetischen Element, einem Plasmid, eingebettet ist, welches möglicherweise durch horizontalen Gentransfer von ETBF- zu NTBF-Stämmen übertragen werden kann (Franco AA et al., 1999).

Die meisten ETBF besitzen eine Kopie des *bft*-Gens sowie der BfPAI. Allerdings wurden auch einige wenige Stämme mit zwei Kopien der Gene *bft* und *mpII* identifiziert, so dass auf die Anwesenheit zweier BfPAI geschlossen werden konnte (d'Abusco AS et al., 2000). Es wurde ebenfalls festgestellt, dass von einem ETBF-Stamm immer nur ein BFT Toxin Typ freigesetzt wird (Wick EC & Sears CL, 2010).

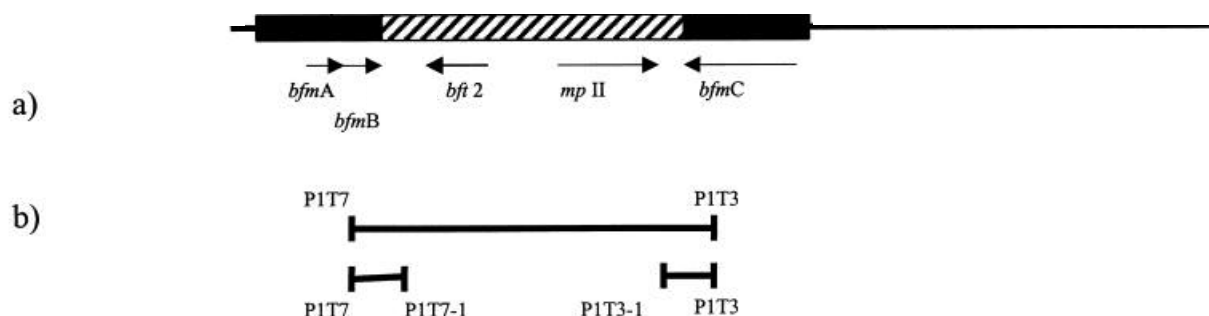


Abb. 5: Pathogenitätsinsel b. Primerlokalisation n. Franco, AA 1999. Schematische Darstellung der verwendeten Primer-Sequenzen modifiziert nach Franco AA et al. 1999.

Bisher wurden drei verschiedene *bft*-Allele nachgewiesen (*bft*-1, *bft*-2, *bft*-3) (Sears CL, 1999; Kato N et al., 2000), welche jeweils einzigartig, jedoch nah miteinander verwandt sind. Die entsprechenden Toxine zeigen unterschiedliche biologische Aktivitäten, die höchste zeigte BFT-2, die niedrigste BFT-3.

1.3 Weitere Krankheitsbilder

1.3.1 Infektionen/Sepsis

Als Sepsis wird ein klinisches Syndrom bezeichnet, welches die Komplikation einer schweren Infektion darstellt und als systemische Antwort auf diese gewertet werden kann. Voraussetzungen sind sowohl eine Bakteriämie als auch ein Systemisches Inflammatorisches Response Syndrom (SIRS). Obwohl der Begriff Sepsis eng mit der modernen Intensivmedizin verknüpft ist, handelt es sich um einen sehr alten medizinischen Terminus. Das Wort „Sepsis“ wurde bereits von Hippokrates (ca. 460–370 v. Chr.) eingeführt und leitet sich von dem griechischen σήπω ("faul machen") ab. Eine moderne Definition der Sepsis wurde 1989 von Balk RA & Bone RC veröffentlicht: Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion (SIRS). Diese Definition wurde 1991 von einer Konsensus-Konferenz des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine weitergeführt (Bone RC, 1992). In der Genese dieser Erkrankung spielt das Zusammenwirken von Infektion und Immunantwort eine entscheidende Rolle. Die zugrunde liegende Infektion kann bakterieller, viraler, fungaler oder parasitärer Natur sein. 2016 wurde die Sepsis-Definition zuletzt verändert (Rhodes A et al., 2017; Dellinger RP et al., 2017; Gül F et al., 2017). Es handelt sich danach um eine lebensbedrohende Organdysfunktion als Folge einer dysregulierten Antwort des Organismus auf eine Infektion. Bei der Formulierung dieser

Definition wurde darauf Wert gelegt, dass immer eine Infektion die Ursache der festgestellten Organdysfunktionen sein muss.

Anaerobe Bakterien verursachen 1–17% positiver Blutkulturen, die Zahl der damit verbundenen Sepsis-Erkrankungen bleibt unklar. (Brook I, 2010; James PA et al., 2000; Finegold SM et al., 1985). Dabei stellt die *B. fragilis*-Gruppe mit 60 bis 80 Prozent die am häufigsten gefundenen anaeroben Erreger dar (Finegold SM et al., 1985; Zhao H et al., 2012; Bennion RS et al., 1990). Bei intraabdominalen Prozessen macht sie ca. 70% der Blut-Isolate aus, gefolgt von anderen *Bacteroides*-Spezies. Bei der intraabdominalen Sepsis stellen *E. coli* und *B. fragilis* die dominanten Keime dar (Brook I & Frazier EH 1999; 2000). In diesem Zusammenhang werden zwei Phasen definiert, die initiale Phase als generalisierte Entzündungsreaktion des Peritoneums, in welcher *E. coli* als wichtigster Keim fungiert und die zweite Phase mit lokaler Abszessbildung, in der *B. fragilis* als kritischer Faktor gefunden wird (Onderdonk AB et al., 1990; Bartlett JG et al., 1978). Das abszessogene Potential von *B. fragilis* wurde durch Abszessbildung allein durch Kapselpolysaccharide dieses Erregers nachgewiesen (Kalka-Moll WM et al., 2001).

1.3.2 Chronisch-entzündliche Darmerkrankung und kolorektale Tumorbildung

Es wurde festgestellt, dass *B. fragilis* in Konglomeraten mit anderen Bakterien des Darms in der Lage ist, Biofilme zu bilden. Infolge dieser chronischen Besiedlung kommt es möglicherweise zu chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Swidsinski A et al., 2005) oder auch zur Bildung von kolorektalen Tumoren. Das BFT wurde beispielsweise in der Darmschleimhaut nahe der Tumoren bei erkrankten Patienten nachgewiesen (Boleij A et al., 2015; Purcell RV et al., 2017; Toprak NU et al., 2006).

2 Aufgabenstellung

Ziele der Untersuchungen an 271 klinischen Isolaten der Spezies *B. fragilis* waren:

1. Die Zusammenstellung einer umfangreichen Stammsammlung unterschiedlicher geographischer Herkunft (USA und Deutschland) sowie verschiedener klinischer Herkunft, insbesondere von Blutkulturisolaten
2. Die Überprüfung der Spezies-Identifizierung mittels phänotypischer Reaktionen (Koloniemorphologie, biochemische Methoden) sowie nachfolgender molekularer Tests (PCR-Fingerprinting)
3. Die molekulare Charakterisierung zweier phänotypischer Gruppen mit verschiedenen Resistenzmustern innerhalb der Spezies *B. fragilis* mittels der PCR-Fingerprint-Technik
4. Der molekulare Nachweis von Enterotoxin-Gen-Abschnitten und Rückschluss auf das Vorhandensein der BfPAI sowie
5. Die Untersuchung des Vorhandenseins sowie der molekularen Struktur der NTBF „Flanking Regions“ bei spezifischen Stämmen durch Sequenzanalysen.

3 Material und Methoden

3.1 Stämme

Für diese Arbeit wurden 275 Stämme gesammelt und prä-identifiziert zu den Spezies *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus* und *Bacteroides vulgatus*. Es handelte sich um vier Referenzstämme und 271 klinische Isolate, die zum Teil am IML konsekutiv gesammelt wurden.

3.1.1 Referenzstämme

Die Referenzstämme der Spezies *Bacteroides fragilis* stammten aus zwei verschiedenen Stammsammlungen: der American Type Culture Collection (ATCC), USA, und dem Virginia Polytechnical Institute (VPI), USA.

ATCC 25285	Typstamm (NTBF Gruppe I)
ATCC 43858	Referenzstamm (ETBF Gruppe I; Myers LL et al., 1987; Myers LL et al., 1989)
ATCC 43859	Referenzstamm (ETBF Gruppe I; Myers LL et al., 1987)
VPI 2393	Referenzstamm (Gruppe II; Johnson JL, 1978, <i>B. fragilis</i> DNA-Homologiegruppe II)

3.1.2 Auswahl der Klinischen Stämme

Die 271 klinischen Stämme dieser Arbeit stammen aus sechs Quellen Deutschlands und der Vereinigten Staaten. Sie gehören drei verschiedenen Spezies des Genus *Bacteroides*, *Bacteroides fragilis* (n=261), *Bacteroides ovatus* (n=5) und *Bacteroides vulgatus* (n=5) an. Sie wurden aus Haut- und Weichgewebsinfektionen sowie Blutkulturen isoliert (s. Anlage, Tab. 22, S. 95).

3.1.2.1 Vergleichsstämme der Spezies *Bacteroides vulgatus* und *ovatus*

Zu Vergleichszwecken wurden jeweils fünf Stämme der Spezies *Bacteroides vulgatus* und *Bacteroides ovatus* (s. Tab. 1, S. 7) in die Arbeit aufgenommen.

Anhand von Voruntersuchungen (Tang YJ, 2006) wurde davon ausgegangen, dass diese Stämme anderer *Bacteroides* Spezies kein Toxin bilden und demzufolge die Toxin-Gen-Tests negativ ausfallen (negativ-Kontrolle) würden.

Tab. 2: Stamm-Nummern und Herkunft der Vergleichsstämme.

Spezies	Stamm-Nummer	Herkunft
<i>B. vulgatus</i>	1999	RMA
<i>B. vulgatus</i>	1997	RMA
<i>B. vulgatus</i>	295	RMA
<i>B. vulgatus</i>	5361	RMA
<i>B. vulgatus</i>	5475	RMA
<i>B. ovatus</i>	5736	RMA
<i>B. ovatus</i>	5315	RMA
<i>B. ovatus</i>	5351	RMA
<i>B. ovatus</i>	6506	RMA
<i>B. ovatus</i>	6529	RMA

3.1.2.2 Blutkulturen – Invasive Stämme

Bei den in der Anlage (Tab. 22, S. 95) aufgeführten Stämmen handelte es sich um 70 Blutkulturisolate. Sie stammten aus der LOY (n=33), aus dem RMA (n=30) und aus dem IML (n=7).

3.1.2.3 Nicht-Blutkulturen – Nicht-invasive Stämme

In Tab. 23 (Anlage, S. 97) wurden die nicht aus Blutkulturen stammenden Isolate aufgeführt. Von diesen wurden 113 Stämme innerhalb von 1.5 Jahren konsekutiv im IML isoliert. Die konsekutiv im IML isolierten Blutkulturen wurden hier der Vollständigkeit halber mit aufgeführt. Aufgrund der geringen Zahl dieser Isolate lässt sich erkennen, dass es sehr zeitaufwendig war, *Bacteroides* aus Blutkulturen zu akquirieren.

3.2 Kulturtechnik

3.2.1 Nährmedien

Für die Kultivierung der *Bacteroides*-Stämme wurde Columbia-Blut-Agar (CBA) der Firma Oxoid (CM 331, England) verwendet. Dieser wurde im IML mit Vitamin K (Fa. Sigma, D) und Hämin (Fa. Sigma, D) supplementiert. Aerobe Kulturkontrollen wurden auf Schafsblutagar (5%, Fa. Oxoid, Deutschland) ausgeführt. Des Weiteren wurden Selektivnährböden benutzt (Columbia-Blut-Agar (CBA) plus Gentamicin). Um die Galleresistenz zu überprüfen, wurde BBE (Fa. Becton Dickinson, Deutschland) eingesetzt.

3.2.1.1 Columbia-Blut-Agar

Der Basisnährboden der Firma Oxoid, Basingstoke, England (Nr. CM 331) (Columbia Agar Base, S.2-63, The Oxoid Manual, E.Y. Bridson 8th Edition 1998, UK) bestand aus:

Spezialpepton	23 g
Stärke	1 g
NaCl	5 g
Agar	10 g
A. dest. ad	1 l

Der pH-Wert war 7,3. Der Nährboden wurde nach dem Kochen 15 min bei 121°C autoklaviert und kühlte dann auf 48°C. Die Zusätze wurden danach hinzugefügt (je 1000ml):

Hämin (1 mg/ml)	5 ml
Vitamin K ₁ (1 mg/ml)	1 ml
Na ₂ HPO ₄ (0.1%)	1 ml
Steriles defibriertes Schafsblut (5%)	25 ml

3.2.2 Inkubation der anaeroben Kulturen

Zur Keimanzucht auf Columbia–Blut–Agar wurden 0.05ml Keimsuspension (MacFarland 0.5 (1.5×10^8 Keime/ml)) eingesetzt. Die Kulturen des Genus *Bacteroides* wurden unter anaeroben Bedingungen angezüchtet.

Die Anaerobiose wurde in einer Anaerobier–Box (Modell WA 6600, Heraeus, Deutschland), welche eine kontinuierliche Gasatmosphäre (85% N₂, 10%CO₂, 5%H₂) gewährleistet, sichergestellt. Im Bereich des Inkubators lag eine Temperatur von $37 \pm 2^\circ\text{C}$ vor. Mittels eines Anaerobierindikators (Resazurin, Farbumschlag von rosa nach weiss bei ca. 50mV) (Fa. Oxoid, Wesel, D) wurde das vorhandene Redoxpotential innerhalb der Anaerobier–Box geprüft. Kulturen wurden nach 24–48 Stunden weiter getestet.

3.3 Gruppendifferenzierung der Isolate

3.3.1 Koloniemorphologie

Zur makroskopischen Zuordnung der Stämme wurde deren Wachstum auf CBA beurteilt. Nach 24 bis 48 Stunden waren graue glänzende Kolonien sichtbar. Bei der Subkultur auf BBE waren nach 24 bis 48h schwarze Kolonien mit einem Durchmesser von ein bis zwei Millimetern gewachsen. Auf den Kontrollplatten, welche aerob bzw. unter CO₂–Einfluss bebrütet wurden, war kein Wachstum nachweisbar.

3.3.2 Zellmorphologie – Gramfärbung

Diese Methode diente der Beurteilung der Zellmorphologie der Stämme. Mehrere Kolonien wurden angetippt und die Bakterienmasse in 0.9% NaCl auf einen Objektträger gebracht und an der Luft getrocknet. Danach erfolgte eine Fixierung durch dreimaliges Erhitzen über einer nichtleuchtenden Flamme. Die Gramfärbung wurde mittels Gentianaviolett (3min), Wasser (10s), Lugol'scher Lösung (2min), Alkohol (10s), Fuchsin (1min) und Wasser (10s) durchgeführt. Grampositive Zellen erschienen blau-violett; gramnegative Zellen erschienen hellrot.

3.3.3 Differenzierung mittels Blättchentest

Nach der Applikation verschiedener Test-Blättchen auf beimpfte CBA wurden diese 48h bei 37°C (anaerob) bebrütet. Anident-Disks (Firma Oxoid, D) wurden ausgewählt: Vancomycin (5µg), Kanamycin (1000µg) und Colistin (10µg) (Fa. Oxoid, D). Durch das Ausmessen der Hemmhöfe nach ausreichendem Wachstum wurde die Gruppendifferenzierung der Stämme vorgenommen (sensitiv (S) – Hemmhof >10mm, resistent (R) – Hemmhof <10mm).

3.3.4 Biochemische Leistungsprüfung

Zur Identifizierung der *Bacteroides*-Stämme wurden zwei verschiedene Testsysteme benutzt, welche in der Zelle präformierte Enzyme nachwiesen. Einzelne Kolonien wurden in vorgegebene Medien der Hersteller inokuliert und nach entsprechender Zeit ausgewertet. Die Testkits waren RapID ANA II (Innovative Diagnostic Systems, USA) und RAPID ID 32A (Bio Mérieux, Frankreich) (Kitch TT & Applebaum PC, 1989). Der Reaktionsausfall der Schlüsselreaktionen wurde entsprechend der Vorgaben der Hersteller ausgewertet. Weiterhin wurden PRAS Röhrchen (Fa. Anaerobe Systems, USA) zum Nachweis der Galle-Resistenz und der Indol-Bildung sowie der Spot-Indoltest (Fa. Becton Dickinson, D) eingesetzt. Der Nachweis der Katalase-Bildung erfolgte im Test mit 3.5%iger H₂O₂ Lösung. Die Testablesung erfolgte entsprechend der Vorgaben der Hersteller bzw. entsprechend der Angaben im Wadsworth-KTL-Manual (Jousimies-Somer H., 2002).

3.4 Molekularbiologische Analysen

3.4.1 DNA-Extraktion

Bei ausreichendem Koloniewachstum nach 48h wurden nach Reinheitskontrolle mittels Gram-Präparat jeweils zwei bis vier Kolonien mit Hilfe des QIAamp Tissue Kit (Qiagen, Deutschland) zur DNA-Präparation verwendet.

Durch Anwendung dieses Kits (mit guter Aufreinigung) war es möglich, die DNA über längere Zeit aufzubewahren. Die extrahierte DNA wurde in A. dest. (DNase und RNase – frei) eingebracht, geteilt, und je zur Hälfte bei -76°C zur längeren Aufbewahrung eingefroren bzw. zur sofortigen Benutzung in den Kühlschrank bei $4-8^{\circ}\text{C}$ gestellt.

Protokoll (Entsprechend der Vorschrift des Herstellers Fa. Qiagen, Deutschland)

- Zunächst erfolgte die Ernte von 2×10^9 Keimen (entsprechend $2 \times \text{Loop}$ mit $1 \mu\text{l}$ Fassungsvermögen), folgend wurde die Suspension in $180 \mu\text{l}$ Tissue-Lyse-Puffer im 1.5ml Eppendorf-Becher geben.
- Eine $20 \mu\text{l}$ Proteinase K Stammlösung wurde dazugegeben, dann die Lösung mit dem Vortexmixer vorbehandelt, folgend wurde die Inkubation im Schüttelwasserbad bei 55°C für mindestens 3 Stunden durchgeführt.
- Unter Zugabe von $200 \mu\text{l}$ Lyse-Puffer wurde die Lösung mit dem Vortexmixer vorbehandelt. Dann erfolgte die Inkubation bei 70°C für 10min. (ohne RNase)
- $210 \mu\text{l}$ Ethanol absolut (96–100%) wurden zugefügt und mit dem Vortexmixer in eine homogene Suspension gebracht.
- Diese Suspension wurde in ein Spin Column eingebracht, welches sich in einem 2ml Collection Tube befand. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 8000 U/min für 1min. Das Filtrat des Tubes wurde verworfen, das Tube wiederverwendet. Der Eluations-Puffer für Schritt 10 wurde auf 70°C vorgewärmt.
- $500 \mu\text{l}$ Wasch-Puffer wurden zugegeben und bei 8000 U/min für 1min zentrifugiert, das Filtrat verworfen, das Tube weiterverwendet.

- 500µl Wasch-Puffer wurden erneut zugegeben und bei 13.000 U/min für 3min zentrifugiert, die Flüssigkeit entfernt.
- Das Spin Column wurde in einen 1.5ml Eppendorf Becher gegeben, das Collection Tube verworfen.
- 200µl vorgewärmter Eluations-Puffer wurde auf 70°C für 5min inkubiert, dann erfolgte die Zentrifugation bei 8.000 U/min für 1min. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt.

3.4.2 PCR-Reaktionsansätze

Um die PCR-Testung zu vereinfachen, wurde zu jedem Versuchsansatz ein Mastermix erstellt, welcher die notwendigen Chemikalien enthielt, und der nach Fertigstellung auf die gewünschte Menge Eppendorf Becher verteilt wurde. Die extrahierte DNA wurde hinzugegeben und die Proben in den vorbereiteten Thermocycler gestellt. Dieser ermöglichte durch voreingestellte Temperaturveränderungen nach ebenfalls vorbestimmtem Zeitschema die PCR. Zu den Chemikalien gehörten Puffer, Nukleotide, Magnesiumionen, Primer, Taq-Polymerase und A. dest.

- Bei dem verwendeten Puffer handelte es sich um 10xPCR-Puffer (100mM Tris-HCl, pH 8.3 bei 25°C, 50mM KCl, 15mM MgCl₂, 0.01% Gelatine, 3mM Magnesium; Perkin Elmer Cetus, USA).
- Die Nukleotide (dNTP) bestanden aus 200µM von jeweils dATP, dCTP, dGTP und dTTP (Pharmacia Biotech, USA).
- In einem Reaktionsansatz sollte die Konzentration der Magnesiumionen 1.5 bis 2.5mM betragen (Gassen HG et al., 1994). Die Ionen mussten im Überschuss vorhanden sein, da sie von den dNTPs im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 gebunden werden und einen löslichen Komplex bildeten, wodurch der dNTP-Einbau und die Polymeraseaktivität begünstigt wurden.

- Die Primer wurden in einer spezifischen Endkonzentration (siehe PCR Protokolle) zugegeben.
- Als Enzym wurden 2.5 Units der Taq-DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq) der Firma Perkin Elmer Cetus, USA, benutzt.
- Durch Zugabe von A. dest. wurde der Mastermix auf das angestrebte Reaktionsvolumen aufgefüllt. Des Weiteren wurde die benötigte Negativkontrolle des Ansatzes mit A. dest. anstatt DNA hergestellt.

3.4.2.1 Optimierung der PCR-Ansätze nach Taguchi

Zur Optimierung des Mischungsverhältnisses der Chemikalien zur besseren Deutlichkeit der Banden im Gel wurde eine mathematische Optimierungsmethode angewandt (Cobb BD & Clarkson JM, 1994).

Tab. 3: Darstellung der eingesetzten Reagenzienmengen für die Optimierung der PCR.

Mastermix	H ₂ O *	Puffer 1:10*	dNTP 2.5mM*	Primer 1 10pmol/μl*	Primer 2 10pmol/μl*	DNA 10ng/μl*	Taq 0.5U/μl*
1	19.5	2	0.5	0.75	0.75	1.2	0.3
2	17.7	2.5	1.5	0.75	0.75	1.5	0.3
3	15.3	3	3	0.75	0.75	1.9	0.3
4	15	2.5	3	1.5	1.5	1.2	0.3
5	16.7	3	0.5	1.5	1.5	1.5	0.3
6	16.3	2	1.5	1.5	1.5	1.9	0.3
7	13	3	1.5	3	3	1.2	0.3
8	12.2	2	3	3	3	1.5	0.3
9	13.8	2.5	0.5	3	3	1.9	0.3

*Angaben der Reagenzien in ml

3.4.3 PCR-Bedingungen

PCR-Tests fanden in mehreren Zwischenschritten statt, welche durch Temperaturunterschiede gekennzeichnet waren: Denaturierung, Annealing und Extension.

- Bei der Denaturierung wurde der Doppelstrang der DNA gelöst, so dass sich im nächsten Schritt der Primer anlagern konnte. Eine Temperatur von 93–95°C erwies sich als günstig, besonders da bei höheren Temperaturen die Halbwertszeit der Taq-Polymerase erniedrigt wurde.
- Während des Annealings lagerte/n sich der/die Primer an den Einzelstrang der DNA an.
- Die Extension der DNA stellte den letzten Schritt der PCR dar, in welchem sie mit Hilfe der Taq-Polymerase durch die Anlagerung von freien dNTPs elongiert wurden. Die Final Extension war die Elongationsphase, in welcher unfertige PCR-Produkte vervollständigt wurden.
- Die optimale Zyklenzahl der PCR lag bei 25 Zyklen, wobei rechnerisch aus einer Ziel-DNA 3.2×10^7 Kopien hergestellt wurden. Bei weiteren Zyklen nahm die Kopienzahl nur noch linear zu.

3.4.4 PCR-Fingerprint-Technik

Das PCR-Fingerprinting stellt neben einer molekularen Charakterisierungsmethode von Mikroorganismen eine Methode zur Spezies-Identifizierung bei gramnegativen Anaerobiern durch DNA-Polymorphismen (Sequenzvariationen) dar. Spezielle DNA-Abschnitte wurden mittels Thermocycler vervielfacht und die resultierenden Fragmente z.B. durch Gel-Elektrophorese dargestellt.

3.4.4.1 Primer

Der t-DNA-Primer T3B (Tab. 4) wurde als Universalprimer bezeichnet (Welsh J & McClelland M, 1991) und wurde hier als Einzelprimer eingesetzt.

Es wurden unterschiedliche Bandenmuster mit Spezies- und Stamm-spezifischen Banden produziert. Für die Differenzierung und Darstellung der PCR-Gruppen erschien dieser Primer aufgrund des produzierten Bandenmusters günstig.

Tab. 4: Primersequenz T3B.

Primer	Fragmentlänge	Primersequenz
T3B	variabel	5' –AGGTCGCGGGTTCGAATCC–3'

3.4.4.2 PCR-Protokoll für T3B

Es handelte sich um 50µl-Ansätze, bei welchen jeweils 2.5µl der zuvor extrahierten DNA gebraucht wurden.

T3B Mastermix:	H ₂ O	33	µl
	Puffer	5	µl
	dNTP	4	µl
	T3B	5	µl
	Taq- Polymerase	0.5	µl
	DNA	2.5	µl

3.4.4.3 Cyclyer-Profil

Das folgende Programm für den Thermocycler (DNA Thermocycler 480, Perkin Elmer, Cetus, USA bzw. Robocycler mit Heizdeckel, Stratagene, Deutschland) wurde für diesen Primer verwendet.

T3B:	93°C	1 min	}	35	Zyklen
	50°C	1 min			
	72°C	2.5min			
	4°C	∞		∞	

Nach der Amplifizierung im Thermocycler wurden die Proben aus den 50µl-Ansätzen in einer Vakuumzentrifuge (Fa. Speed Vac, Savant, USA) auf ein Volumen von ca. 20µl konzentriert.

3.4.5 Spezifische PCR zum Nachweis von Teilen der BfPAI

3.4.5.1 Primer

Die Primer Paare (Tab. 5) wurden eingesetzt, um spezifische Sequenzen nachzuweisen.

Tab. 5: Spezifische Primer zum Nachweis spezifischen Sequenzen der BfPAI (Razeq-Primer: RS-3 und RS-4 nach Shetab R, et al., 1998, Kato-Primer: GBF 101 und GBF 110 nach Kato N et al., 1996, MP-Primer: LO I und RO I nach Moncrief JS et al., 1998, 1100bp-Primer: PIT3 und PIT3-1, 1300bp-Primer: PIT7 und PIT7-1, 1600bp-Primer: PIT7 und PIT3 nach Franco AA et al., 1999).

Primer	Fragment	Fragmentlänge	Primersequenz (5'→3')
RS-3 RS-4	<i>bft</i>	367bp	TGAAGTTAGTGCCCAGATGCAGG GCTCAGCGCCCAGTATATGACC
GBF 101 GBF 110	<i>bft</i>	358bp	AGCCGAAGACGGTGTATGT CCCCTGGCTTCAAAATCCGAAGC
LO I RO I	<i>mpll</i>	350bp	CCACCGTGCCAATGTCAGATA CTGAAGAACGAGGCGGTATC
PIT3 PIT3-1	<i>T31-T3</i>	1100bp	TTCAACCTGATCGATCCGGAAGATCCG GGTAGTGCTTATGTCCCTGCAACCCTA
PIT7 PIT7-1	<i>T7-T71</i>	1300bp	GCTGGTAGACTACCTGAGTAAGGAGTC GCTTCCGTACCCAGGTATCTCTCCATA
PIT7 PIT3	<i>PIT7-PIT3</i>	1600bp	GCTGGTAGACTACCTGAGTAAGGAGTC TTCAACCTGATCGATCCGGAAGATCCG

3.4.5.2 PCR-Protokolle

Die folgenden Protokolle wurden je nach angewandtem Primer ausgeführt. Es handelte sich um 25µl- bis 50µl-Ansätze, in welchen jeweils 1.2µl bis 2.5µl der zuvor extrahierten DNA eingesetzt wurden.

GBF 101 und 110:	H ₂ O	15.7 µl
(358bp)	Puffer	2.5 µl
	dNTP	2 µl
	RS-3	1.5 µl

	RS-4	1.5	μl
	Taq	0.3	μl
	DNA	1.5	μl
RS-3 und RS-4: (367bp)	H ₂ O	13	μl
	Puffer	3	μl
	dNTP	1.5	μl
	RS-3	3	μl
	RS-4	3	μl
	Taq	0.3	μl
	DNA	1.2	μl
MP I und MP II: (350bp)	H ₂ O	29.7	μl
	Puffer	5	μl
	dNTP	4	μl
	MgAc	3	μl
	MP I	3	μl
	MP II	3	μl
	Taq	0.3	μl
	DNA	2	μl
P ₁ T ₃ und P ₁ T ₃₋₁ : (1100 bp)	H ₂ O	29.2	μl
	Puffer	5	μl
	dNTP	4	μl
	MgAc	3	μl
	P ₁ T ₃	3	μl
	P ₁ T ₃₋₁	3	μl
	Taq	0.3	μl
	DNA	2.5	μl

P ₁ T ₇ und P ₁ T ₇₋₁ : (1300 bp)	H ₂ O	29.2	μl
	Puffer	5	μl
	dNTP	4	μl
	MgAc	3	μl
	P ₁ T ₇	3	μl
	P ₁ T ₇₋₁	3	μl
	Taq	0.3	μl
	DNA	2.5	μl

P ₁ T ₃ und P ₁ T ₇ : (1600 bp)	H ₂ O	29.2	μl
	Puffer	5	μl
	dNTP	4	μl
	MgAc	3	μl
	P ₁ T ₃	3	μl
	P ₁ T ₇	3	μl
	Taq	0.3	μl
	DNA	2.5	μl

3.4.5.3 Cyclor-Profile

Die folgenden Programme für den Thermocycler (DNA Thermocycler 480, Perkin Elmer Cetus, USA bzw. Robocycler mit Heizdeckel, Stratagene, Deutschland) wurden für die PCR verwendet.

RS-3; RS-4;

GBF 101; GBF 110:	95°C	2min	1	Zyklus
	95°C	1min	45	Zyklen
	65°C	1min		
	72°C	1min		
	72°C	2.5min	1	Zyklus
	6°C	∞	∞	

MP I; MP II:	Denaturierung	94°C	2min	1	Zyklus
	Denaturierung	94°C	0.5min	35	Zyklen
	Annealing	62°C	0.5min		
	Extension	72°C	0.5min		
	Final Extension	72°C	2.5min	1	Zyklus
	Aufbewahrung	6°C	∞	∞	
P ₁ T ₃ ; P ₁ T ₃₋₁ ; P ₁ T ₇ ; P ₁ T ₇₋₁ :		94°C	5min	1	Zyklus
		94°C	1min	30	Zyklen
		66°C	2min		
		72°C	1min		
		72°C	5min	5	Zyklen
		06°C	∞	∞	

Nach der Amplifizierung im Thermocycler wurden die Proben aus den 50µl-Ansätzen in einer Vakuumzentrifuge (Speed Vac, Savant, USA) auf ein Volumen von ca. 20µl konzentriert, die 25µl-Ansätze wurden sofort weiterverwendet.

3.4.6 Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Herstellung der 1.5%igen Gele wurden 4.5g Agarose (Pharmacia Biotech Inc., USA) mit Hilfe einer Mikrowelle vollständig in 300ml 0.5 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA, Fa. Sigma, Deutschland) gelöst und nach Abkühlung auf 60°C mit 30µl Ethidiumbromid (C₂₁H₂₀N₃Br) 10mg/ml (Fa. Sigma, Deutschland) versetzt. Nach ca. zwei Stunden war das Gel in der Gelgießvorrichtung erstarrt und zur elektrophoretischen Trennung der Proben einsetzbar.

Um die Proben auf das Gel in die Elektrophoresekommer geben zu können, mussten sie jeweils mit einer Beschwerungslösung im Verhältnis von 1:10 versetzt werden (gel loading solution, Sigma, Deutschland). Zur Beurteilung des Molekulargewichts der PCR-Produkte wurden in die erste und die letzte Geltasche ca. 10µl eines base pair ladders (1kb-ladder, Fa. Gibco BRL Life Technologies, Deutschland) gegeben.

Die Agarose-Gele, auf welche die Proben mit den amplifizierten Fragmenten aufgetragen wurden, wurden in 0.5 x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA, Sigma, Deutschland) in Submarin-Elektrophoresekammern (Gibco BRL, USA) gegeben. Die elektrophoretische Trennung dauerte fünf bis sieben Stunden bei 3V/cm (U=95 V).

3.4.7 Auswertung der Ergebnisse

Die Agarose-Gele wurden mit Ethidiumbromid hergestellt, so dass die entstandenen Banden später mit Hilfe des Transilluminators unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 560nm dargestellt werden konnten. Die Versuchsergebnisse wurden mit Hilfe der Videoprint-Technik (Eagle-Eye-System, Stratagene, Deutschland) und der Polaroid-Fotos (Polaroid, Deutschland) dokumentiert. Sowohl Videoprints, als auch Polaroid-Fotos wurden im TIF-Format gespeichert und später mit dem RFLP-Scan-Programm (Scanalytics, USA) bearbeitet.

3.5 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Es wurden zunächst die folgenden drei Ansätze wurden für die PCR erstellt:

1. Für die Stämme ATCC 28285 und BK 3431a

P ₁ T ₃ und P ₁ T ₇ :	H ₂ O	29.2	µl	*5	146	µl
(1600 bp)	Puffer	5	µl		25	µl
	dNTP	4	µl		20	µl
	MgAc	3	µl		15	µl
	P ₁ T ₃	3	µl		15	µl
	P ₁ T ₇	3	µl		15	µl
	Taq	0.3	µl		1.5	µl
	DNA	2.5	µl			

2. Für die Stämme ATCC 43858, ATCC 43859, RMA 10085, LOY 7869, LOY 6974

P ₁ T ₇ und P ₁ T ₇₋₁ : (1300 bp)	H ₂ O	29.2	μl	*12	350.4 μl
	Puffer	5	μl		60 μl
	dNTP	4	μl		48 μl
	MgAc	3	μl		36 μl
	P ₁ T ₃	3	μl		36 μl
	P ₁ T ₇	3	μl		36 μl
	Taq	0.3	μl		3.6 μl
	DNA	2.5	μl		

3. Für die Stämme ATCC 43858, ATCC 43859, RMA 10085, LOY 7869, LOY 6974

P ₁ T ₃ und P ₁ T ₃₋₁ : (1100 bp)	H ₂ O	29.2	μl	*12	350.4 μl
	Puffer	5	μl		60 μl
	dNTP	4	μl		48 μl
	MgAc	3	μl		36 μl
	P ₁ T ₃	3	μl		36 μl
	P ₁ T ₇	3	μl		36 μl
	Taq	0.3	μl		3.6 μl
	DNA	2.5	μl		

Die drei Ansätze wurden dann nachfolgendem Programm im Thermocycler (Robocycler mit Heizdeckel, Stratagene, Deutschland) amplifiziert:

Window 1:	94°C 5min	1	Zyklus
Window 2:	94°C 1min	30	Zyklen
	66°C 2min		
	72°C 1min		
Window 3:	72°C 5min	1	Zyklus
Window 4:	06°C ∞	∞	

Es wurde initial die oben beschriebene PCR durchgeführt (siehe o.g. Protokolle). Die Sequenzanalyse wurde mittels eines ABI 373 Stretch Automatic Sequencer (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom) im IZKF Core Unit Laboratorium der Universität Leipzig durchgeführt.

Alle erhaltenen Sequenzen wurden mittels einer Datenbank überprüft (BLAST – Basic Local Alignment Search Tool), welches unter folgender Webadresse zu finden ist: www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. BlastN wurde zum Vergleich der einzelnen Nukleotide mit der Datenbank verwendet. Mit dem Programm ClustalW wurden mehrfache Alignments überprüft.

4 Ergebnisse

Klinische Isolate der Spezies *B. fragilis* einschließlich der Referenzstämme sowie der Vergleichsstämme nahe verwandter Spezies (*B. vulgatus* und *B. ovatus*) wurden sowohl phänotypisch als auch mit molekularen Methoden untersucht. Es wurden primär makroskopische und biochemische Untersuchungen zur Spezies-Identifizierung durchgeführt. Im Anschluss wurde die Identifizierung mittels molekularer Methoden verifiziert sowie weitere Gruppen-spezifische Charakteristika innerhalb der Spezies *B. fragilis* molekular nachgewiesen. Spezielle Virulenzfaktoren von *B. fragilis*, wie die Enterotoxinbildung, wurden durch den Nachweis ausgewählter Genabschnitte auf der molekularen Ebene untersucht. Mehrere Stämme wurden zur Sequenzierung ausgewählt.

4.1 Identifizierung mittels phänotypischer Eigenschaften der Spezies *Bacteroides fragilis* Zell- und Koloniemorphologie

Alle klinischen Isolate wurden hinsichtlich ihrer Zell- und Koloniemorphologie untersucht:

Zellmorphologie im Grampräparat (Columbia-Blutagar, 48h)

Die Bakterienzellen zeigten sich als gramnegative, kurze bis mittellange Stäbchen, welche nach einer Wachstumsdauer von 48h eine meist gerade Form aufwiesen (Abb. 6).

Koloniemorphologie auf Columbia-Blutagar (48h)

Die Kolonien von *B. fragilis* erschienen klein (ca. 2mm Durchmesser), grauerund, glänzend.

Gruppendifferenzierung

Ausgewählt wurden schnell wachsende Stämme mit folgendem Muster: Kanamycin resistent; Vancomycin resistent; Colistin resistent (keine Hemmhofbildung) (Abb. 7).

Alle ausgewählten Stämme waren bilophil, wuchsen in PRAS Röhrchen mit 20% Galle-Zusatz und waren Indol negativ im (PRAS Indol-Test und Spot Indol-Test) sowie Katalase positiv.

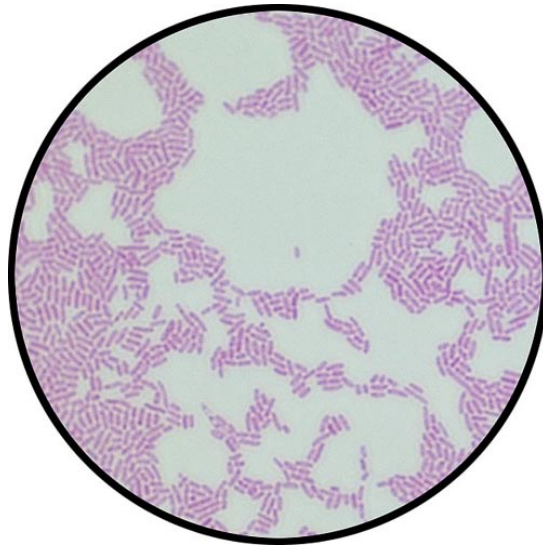


Abb. 6: Grampräparat *B. fragilis*.



Abb. 7: *B. fragilis* Kolonien auf Columbia Blutagar (Ablesung nach 48h, Kanamycin, Vancomycin, Colistin – resistent).

4.2 Biochemische Identifizierung

Zur initialen Testung wurden Schnelltests hinzugezogen. Es wurden n=261 gramnegative, Galle resistente (100%), Spot-Indol-negative (100%), Katalase-positive (100%) Stämme mit dem Muster (Blättchentest) Kanamycin resistent, Vancomycin-resistent und Colistin-resistent identifiziert und danach mittels biochemischer Leistungsprüfung im RapID ANA II (Innovative Diagnostic Systems, USA) und RAPID ID 32A (Bio Mérieux, Deutschland) getestet.

RapID ANA II-System

261 von 261 Stämmen wurden mit 95 bis 99% als der Spezies *B. fragilis* zugehörig identifiziert.

API 32A-System

Ein zweites Testsystem wurde zur Keim-Identifizierung ausgewählt, hauptsächlich um die als Schlüsselreaktion geltende Indol-Reaktion zu bestätigen. Die ausgewählten Stämme zeigten keine Indol-Bildung und wurden mit einer Wahrscheinlichkeit von 96–99% als der Spezies *B. fragilis* zugehörig identifiziert.

Des Weiteren wurden zehn Stämme als negativ-Kontrollen untersucht. Davon wurden fünf als *Bacteroides vulgatus* (Indol negativ) und fünf als *Bacteroides ovatus* (Indol positiv) identifiziert. Alle Stämme waren Galle resistent.

Aufgrund der Schwankungen und Ähnlichkeiten in den Reaktionsausfällen der biochemischen Leistungsprüfung wurden zur Bestätigung der Identifikationsergebnisse sowie zur weiteren Charakterisierung aller Stämme molekulare Tests hinzugezogen.

4.3 Molekulare Untersuchungen

4.3.1 Bestätigung der Spezies-Identifizierung mittels der PCR-Fingerprint-Technik

Zur Bestätigung der zuvor phänotypisch identifizierten Stämme wurde das PCR-Fingerprinting unter Verwendung des Universalprimers T3B (19mer, 19 Nucleotide lang) eingesetzt. Dieser Primer erschien sowohl für die Spezies- als auch für die Gruppen-Identifizierung geeignet und produzierte 4 bis 6 Banden im Bereich von 0.3 – 3kb. Von den 261 phänotypisch als *B. fragilis* identifizierten Stämmen war ein Stamm nicht der Spezies *B. fragilis* zugehörig. Bei allen weiteren 260 Proben wurde mittels PCR-Fingerprinting die biochemische Identifizierung *B. fragilis* bestätigt. Ein Spezies-spezifisches Fragment mit der Länge von 530bp wurde bei 260 Stämmen nachgewiesen (Abb. 8). Die zehn Kontrollstämme *B. vulgatus* und *B. ovatus* charakterisierten Proben wurden bestätigt.

4.3.2 Unterteilung der Spezies in zwei PCR-Fingerprint-Gruppen

Durch den Einsatz des Primers T3B wurden 260 Stämme im Vergleich mit dem Typstamm ATCC 28285 sowie mit dem Referenzstamm für die DNA Gruppe II, VPI 2393, der Spezies *B. fragilis* zugeordnet. Es wurden zwei voneinander unabhängige PCR-Fingerprint-Gruppen nachgewiesen. Die 260 *B. fragilis* Stämme wurden in die PCR-Fingerprint-Gruppen I und II differenziert (Abb. 8). Der überwiegende Teil der klinischen Isolate waren der PCR-Fingerprint-Gruppe I zugehörig (n=241 von 260, 92.7%). N=19 von 260 (7.3%) Isolate gehörten der PCR-Fingerprint-Gruppe II an (Tab. 6). Die Zuordnung erfolgte durch den Vergleich der Haupt-Banden von klinischen Isolaten mit denen der Referenzstämme ATCC 25285 und VPI 2393 (Tab. 6). Die PCR-Gruppe I wurde durch ein Fragment mit 1050bp charakterisiert (Claros MC et al., 2000), hingegen wurde die PCR-Gruppe II durch Fragmente mit der Länge von 370bp gekennzeichnet.

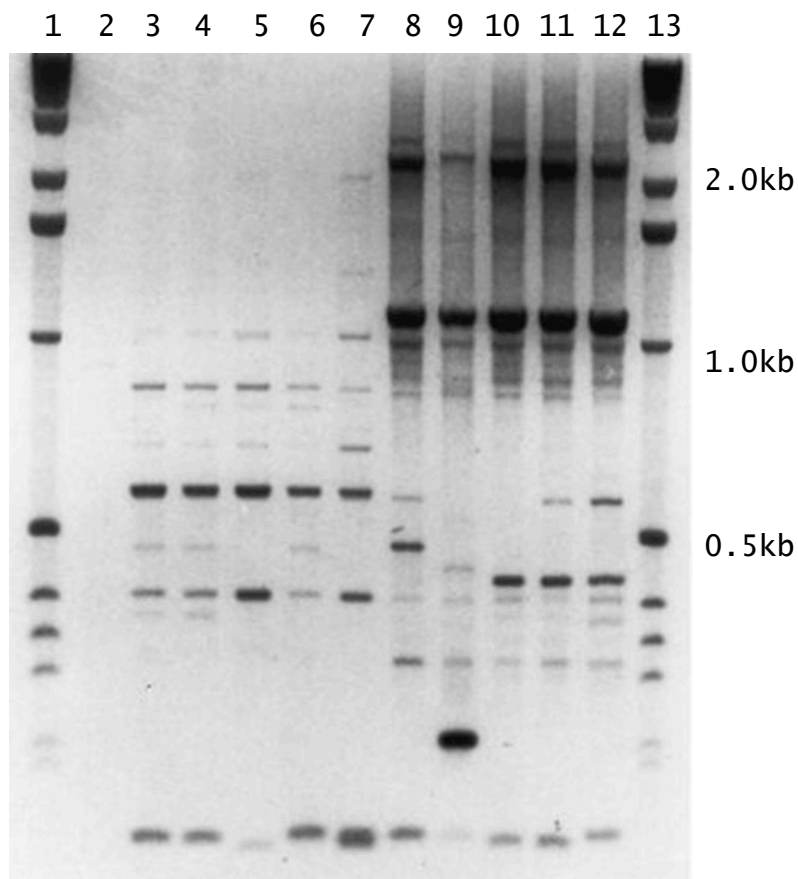


Abb. 8: Klinische Isolate der Spezies *B. fragilis* amplifiziert mit dem Primer T3B bildeten zwei PCR-Fingerprint-Gruppen. Spuren 1 und 13, 1-kb DNA Leiter; Spur 2, Negativ-Kontrolle ohne DNA; Spuren 3 bis 6, RMA 5912, 5935, 6600, und 0309 (multiresistentes klinisches Isolat der PCR-Fingerprint Gruppe II); Spur 7, VPI 2393 (Referenzstamm der DNA Homologie Gruppe II); Spuren 8 bis 11, klinische Isolate der Gruppe I, RMA 5735, 5691, 6791 und 5081; Spur 12, ATCC 25285 (Typstamm *B. fragilis*) (Claros MC et al., 2000).

Tab. 6: Einteilung der klinischen Isolate anhand der Bandenmuster in die PCR-Fingerprint-Gruppen I und II.

Bezeichnung	Anzahl	Prozent (%)
Stämme (gesamt)	260	100
Stämme PCR-Gruppe I	241	92.7
Stämme PCR-Gruppe II	19	7.3

4.4 Nachweis von Enterotoxin und der BfPAI

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden das Vorhandensein von Enterotoxin-Genen innerhalb der Spezies *B. fragilis* sowie die Verteilung von Enterotoxin-Gen positiven Stämmen auf die beiden PCR-Fingerprint Gruppen I und II getestet. Molekulare Tests zum Nachweis der Toxin-Gene und zum Vorhandensein der Pathogenitätsinsel (BfPAI) wurden durchgeführt. Anschließend wurden ausgewählte spezifische Fragmente der BfPAI sequenziert.

4.4.1 Ergebnisse der PCR-Optimierung nach Cobb BD & Clarkson JM, 1994

Die Optimierung der PCR ergab die optimale Konzentration der Chemikalien (Abb. 9). Beispielhaft wurde hier die Abbildung für das Primerpaar GB 101 und GB 110 eingefügt. Für die folgenden Untersuchungen wurde Ansatz 5 (H_2O 15.7 μl , Puffer 2.5 μl , dNTP 2 μl , Primer GB 101 und 110 1.5 μl , DNA 1.5 μl , Taq Polymerase 0.3 μl) benutzt.

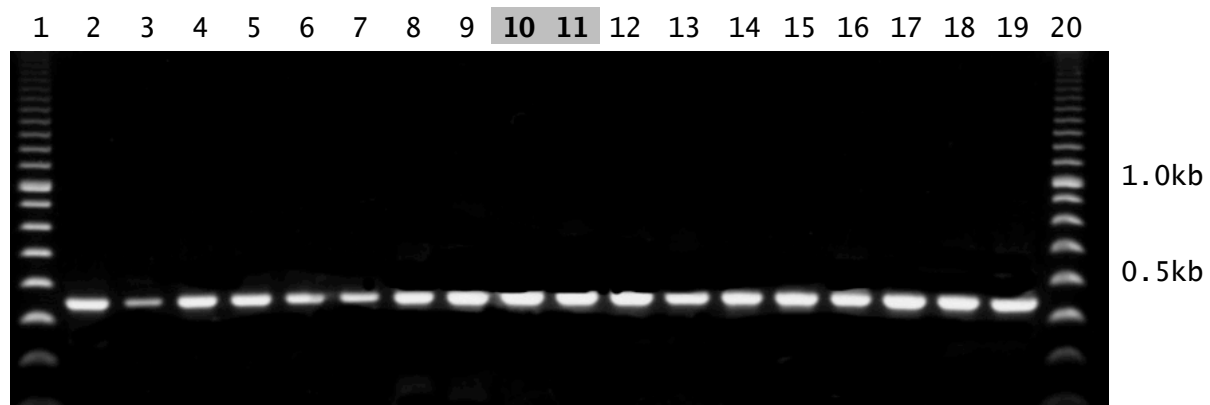


Abb. 9: PCR-Optimierung für die Primer GB 101 und GB 110 für den Stamm ATCC43858: Spuren 1 und 20 Leiter, Spuren 2–19 Ansätze 1–9 (jeweils im Doppel). Ansatz 5 entsprechend Spuren 10 und 11 wurden für die weiteren Untersuchungen ausgewählt.

4.4.2 Nachweis von Enterotoxin codierenden-Genabschnitten als Teile der BfPAI mittels dreier Primerpaare

Zum Nachweis von Enterotoxin codierenden Genabschnitten wurden insgesamt 260 *B. fragilis* Stämme (Tab. 7) untersucht. Damit wurde die Zuordnung der klinischen Isolate zu ETBF bzw. NTBF vorgenommen. ETBF bedeutet, dass drei Primerpaare für *bft* bzw. *mpll* positiv waren. Diese Fragmente wurden in der PCR nachgewiesen. Mittels der Primerpaare RS-3 und RS-4 (Shetab R et al., 1998), GBF 101 und GBF 110 (Kato N et al., 1996) und LO I und RO I (Moncrief JS et al., 1998) wurden 32 (12.3%) ETBF und 228 (87.7%) NTBF Stämme identifiziert. Die 32 ETBF Isolate waren ausnahmslos der PCR Gruppe I zugehörig (Abb. 10 – Abb. 12).

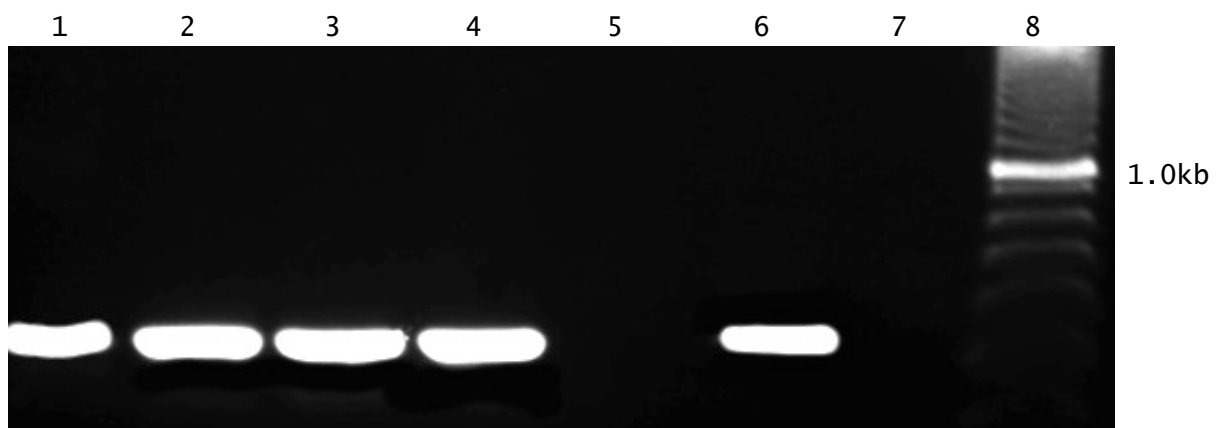


Abb. 10: Primer RS-3 und RS-4: Spuren 1-4, 6 positiv: 278, 19192c, USC607, 5081, ATCC 43859, Spuren 5 und 7 negativ: 25285 und Negativ-Kontrolle ohne DNA, Spur 8: Leiter.

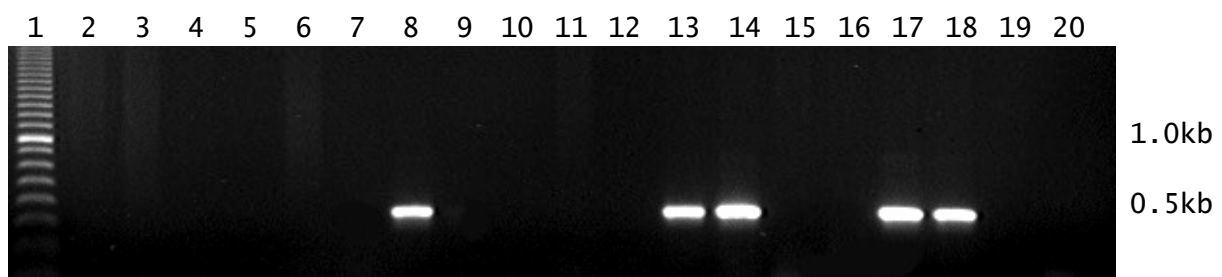


Abb. 11: Primer GB 101 und GB 110: Spur 1 – Leiter, Spuren 2-7 negativ: Spur 2 – 251, Spur 3 – 253 (PCR-Gruppe II), Spur 4 – 249, Spur 5 – 313, Spur 6 – VA 19965a, Spur 7 – VA 19965b, Spur 8 positiv: VA 215b, Spuren 9-12 negativ: Spur 9 – VA 20434a, Spur 10 – a, Spur 11 – 210, Spur 12 – VA 1187, Spuren 13 und 14 positiv: Spur 13 – VA 20273a, Spur 14 – VA 21992d, Spuren 15 und 16 negativ: Spur 15 VA 3042, Spur 16 – VA 2484b, Spuren 17 und 18 positiv: Spur 17 – ATCC 43858, Spur 18 – ATCC 43859, Spur 19: Negativ-Kontrolle ohne DNA.



Abb. 12: Primer LO1 und RO1: Spur 1 – Leiter, Spur 2–13 negativ: Spur 2 – 5521 (Blutkultur), Spur 3 – VK 1404, Spur 4 – 5732 (Blutkultur), Spur 5 5912 (Blutkultur, Gruppe II), Spur – VK 1491, Spur 7 – VK 1492, Spur 8 – 249, Spur 9 – 251, Spur 10 – a, Spur 11 – c, Spur 12 – e, Spur 13 – g, Spur 14, 15 positiv: Spur 14 – VA 11384, Spur 15 – 215b, Spur 16 negativ: VA 9804a, Spur 17, 18 positiv: Spur 17 – ATCC 43858, Spur 18 – ATCC 43859, Spur 19 negativ: ATCC 25285, Spur 20: Negativ-Kontrolle ohne DNA.

Tab. 7: Unterteilung der klinischen Isolate in ETBF (mit BfPAI) / NTBF sowie PCR-Gruppe I und II.

Stämme	Gesamt	Prozent (%)
Gesamtzahl Stämme	260	100
PCR Gruppe I (incl. ETBF)	241	92.7
PCR Gruppe II (keine ETBF)	19	7.3
ETBF	32	12.3
NTBF	228	87.7
1600 pos	116	44.6
1600 neg	144	55.4

4.4.3 PCR-Analyse der Schnittstellen der BfPAI unter Verwendung von zwei Primerpaaren

Die Amplifikation der BfPAI flankierenden Regionen: 30 von 32 ETBF Stämmen trugen die 1.3kb und 1.1kb langen flankierenden Sequenzen der BfPAI, spezifisch für das Pattern I (Abb. 13, Tab. 8):

Pattern I–ETBF enthält die BfPAI und das 1100 und 1300 Fragment.

Pattern II–NTBF trägt weder die BfPAI noch die flankierende Region.

Pattern III–NTBF enthält die flankierende Region trägt aber nicht das BfPAI.

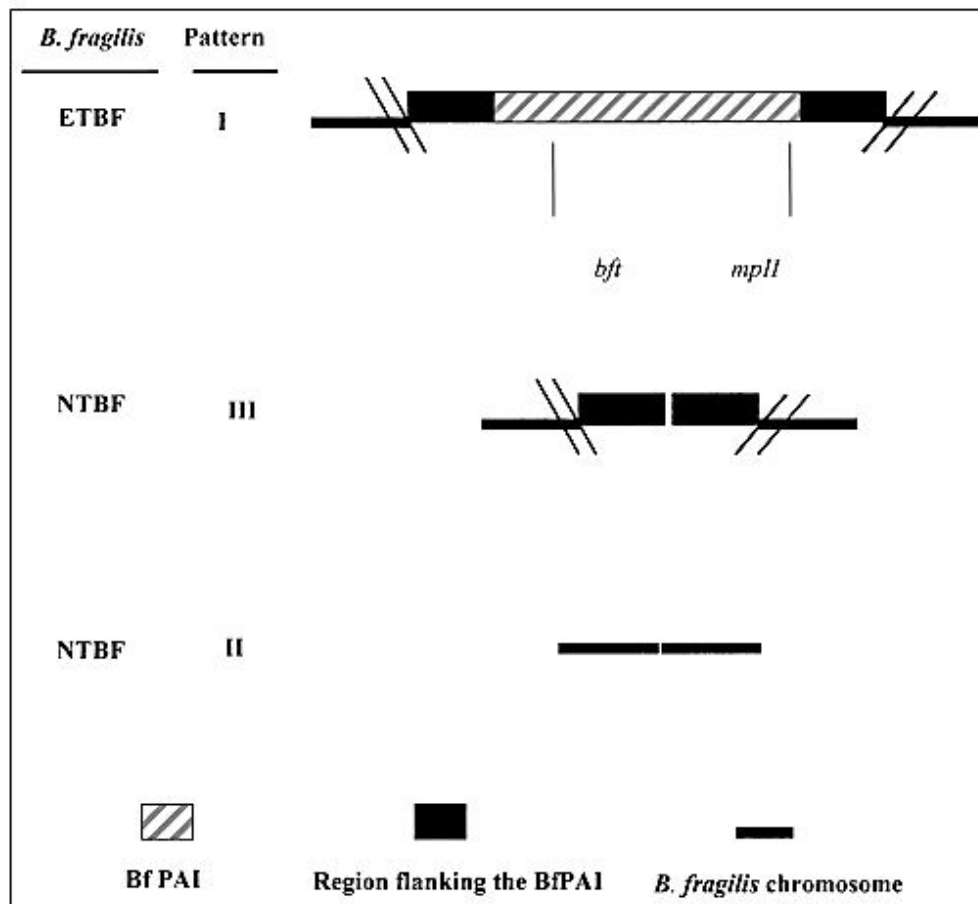


Abb. 13: Modifiziert nach Franco AA et al., 2002.

114 Stämme der 228 NTBF Proben besaßen das 1600bp Fragment der Flanking Region. Dieses Fragment, vermutlich der Integrationsort der BfPAI, amplifiziert mit den Primern P1T7 und P1T3, besaßen nur NTBF Stämme mit Pattern III. Von diesen 114 Isolaten gehörten fünf Stämme der PCR-Gruppe II

an, alle anderen gehörten der PCR Gruppe I an. Bei 30 von 32 Stämmen wurde das 1600bp Fragment nicht nachgewiesen (Abb. 14, Tab. 8). Bei den beiden 1600bp positiven ETBF wurden die 1300 und 1100bp Sequenzen nicht gefunden, außerdem waren sie *mplI* negativ. Sie wurden Pattern I zugeordnet.

Tab. 8: Nachweis der BfPAI und der flankierenden Elemente sowie Einordnung in die PCR-Gruppen I und II.

Stämme	Gesamte Stämme N=260 (NTBF N=228, ETBF N=32)	Gesamte Stämme PCR Gruppe II N=19 (NTBF)
NTBF (ETBF neg), 1600 pos	114	5
NTBF (ETBF neg), 1600 neg	114	14
ETBF (ETBF pos), 1600 pos	2	0
ETBF (ETBF pos), 1600 neg	30	0

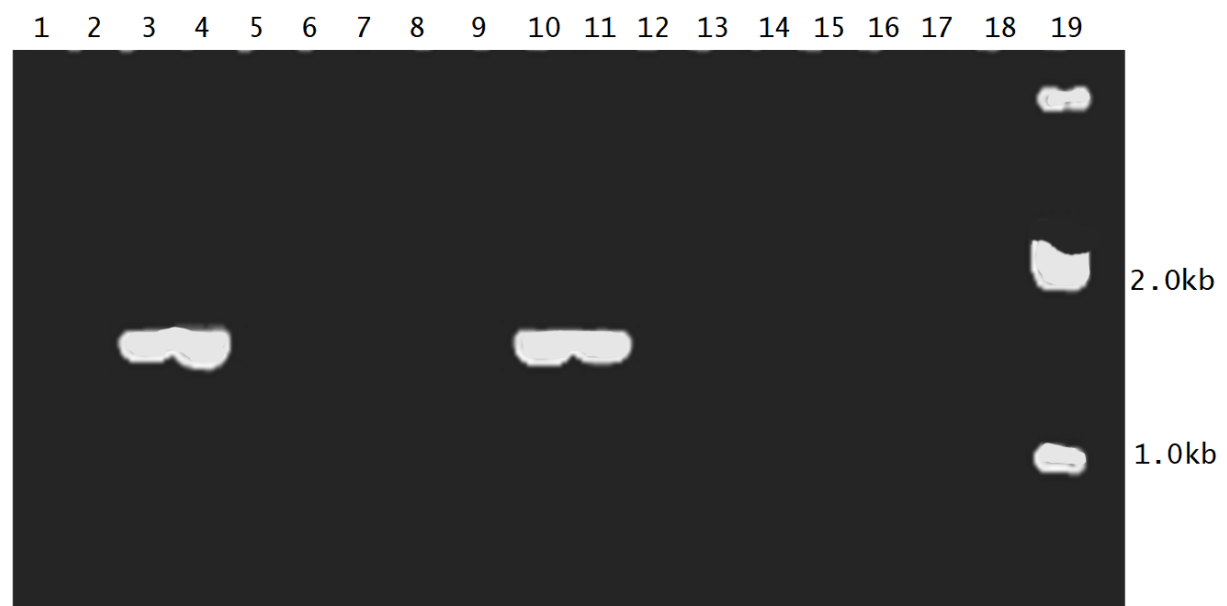


Abb. 14: Amplifikation eines 1600bp langen DNA Fragments, das nur in einigen NTBF Stämmen vorhanden ist. Bei dieser Untersuchung handelte es sich ausschließlich um Blutkulturisolate. Spuren 1-2, 5-9 und 13-17 ETBF Stämme: LOY 6253, 6332, 6408, 6974, 7869, RMA 5081, 5447, 5835, 6470, 6791, 8769, 10085, Spuren 3-4 und 10 NTBF Stämme Loy 6299, 6404, 6530, Spur 11: NTBF ATCC 25285 (positiv für das 1600bp Fragment), Spur 12: ETBF ATCC 43858 (negativ für das 1600bp Fragment), Spur 18: Negativkontrolle ohne DNA, Spur 19: Leiter.

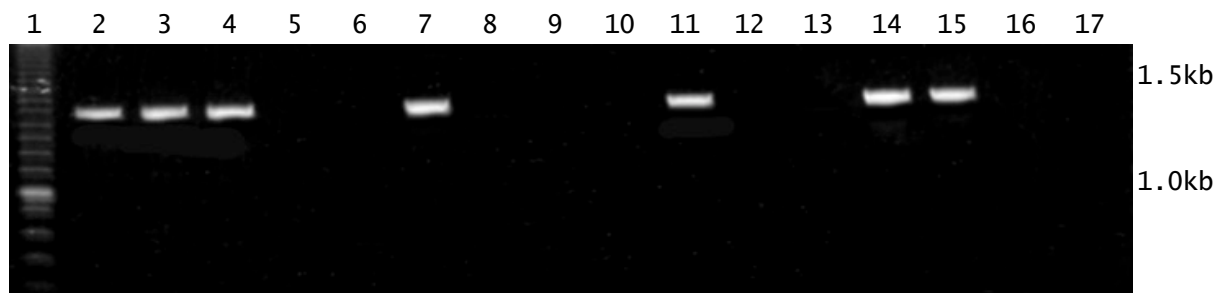


Abb. 15: Screening der linken Schnittstelle mit den Primern P1T7 und P1T7-1: ein Fragment mit der Länge von 1300bp wurde in sieben ETBF Stämmen (Pattern I) nachgewiesen. Spur 1: Leiter, Spuren 2-4 ETBF (Pattern I): 7,11,14,15: VA 5136a, VA 6140a, USC607, VA19192c, 6470, ATCC 43858, ATCC 43859, Spuren 5,6,9,10,12,16 NTBF: Bln7302-1 (Gruppe II), basp München (Gruppe II), VPI2393 (Referenzstamm Gruppe II), 5912 (Blutkultur, Gruppe II), 6600, ATCC 25285, Spur 8: 5691 (ETBF), Spur 13: 6720 (ETBF), Spur 17: Negativkontrolle ohne DNA.

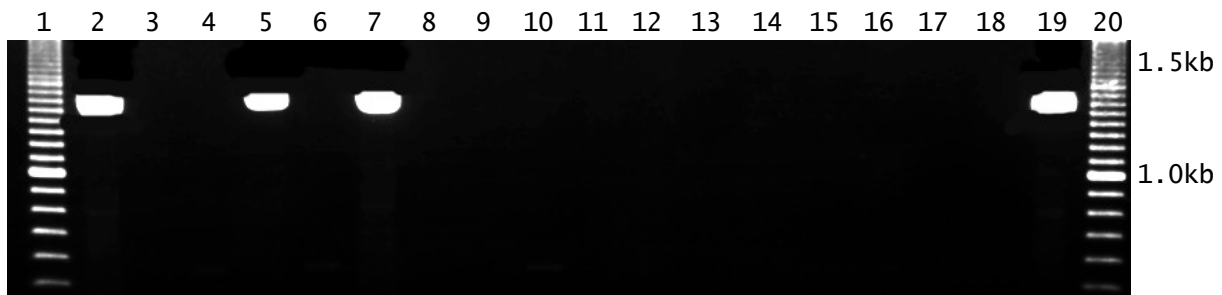


Abb. 16: Screening der rechten Schnittstelle mittels Primer P1T3-1 und P1T3. Die PCR ergab ein 1100bp langes Fragment in allen ETBF Stämmen. Es handelt sich um Blutkulturisolate. Spuren 1 und 20: Leiter, Spuren 2, 5, 7 und 19 ETBF: 6253, 6332, 6408, 6974, Spuren 3,4,6, 8-18 NTBF: 6293, 6299, 6404, 6465 (Gruppe II), 6492, 6530, 6535, 6538, 6667 (Gruppe II), 6687, 6690 (Gruppe II), 6697, 6704, 6712. Negativkontrolle ohne DNA nicht abgebildet.

Tab. 9: Gesamtzahl aller Stämme mit Einteilung in Pattern I, II, III sowie Unterteilung in Blutkultur- und Nicht-Blutkulturstämme.

	Gesamtzahl der Stämme N=260	BK N=70	NBK N=190
Pattern I	32	12	20
Pattern II	114	30	84
Pattern III	114	28	86

4.4.4 Auswertung der Blutkulturoisolate

Es wurden insgesamt 70 Blutkulturoisolate (Tab. 10) untersucht. Dabei wurden mittels der von Kato N et al., 1996, Shetab R et al., 1998 sowie Moncrief JS, et al., 1998 beschriebenen Primerpaare zwölf von 70 (17.1%) ETBF und 58 von 70 (82.9%) NTBF Stämme identifiziert. Sieben von 70 Stämmen (10%) wurden der PCR Gruppe II zugeordnet und 63 der 70 Stämme (90%) gehörten der PCR Gruppe I an. Die zwölf ETBF Isolate waren ausnahmslos der PCR Gruppe I zugehörig (Tab. 10). In diesen zwölf Stämmen wurden die *bft* Gen Fragmente (358bp und 367bp) amplifiziert. Alle diese Stämme trugen ebenfalls das *mplI* Gen Fragment (350bp).

Tab. 10: Verteilung ETBF, NTBF und „flanking Regions“ und PCR-Gruppe I und II in Blutkultur- Isolaten.

Stämme	Blutkulturen	Prozent (%)
Gesamtzahl Stämme	70	100
PCR Guppe I	63	90
PCR Gruppe II	7	10
ETBF	12	17.1
NTBF	58	82.9
1600 pos	28	40
1600 neg	42	60

Das 1600bp Fragment der Flanking Region besaßen 28 Stämme der 58 NTBF Proben. Von diesen 28 Isolaten gehörten zwei Stämme der PCR Gruppe II an, alle anderen gehörten der PCR Gruppe I an. Bei den zwölf ETBF Stämmen wurde das 1600bp Fragment nicht nachgewiesen (Tab. 11).

Tab. 11: Verteilung ETBF, NTBF und Flanking Regions innerhalb der PCR-Gruppe II in Blutkultur-Isolaten.

Stämme	Blutkulturen N=70 (NTBF 58, ETBF 12)	Blutkulturen PCR Gruppe II N=7 (NTBF)
NTBF, 1600 pos	28	2
NTBF, 1600 neg	30	5
ETBF, 1600 pos	0	/
ETBF, 1600 neg	12	/

Tab. 12: Darstellung der einzelnen PCR Ergebnisse für die Blutkulturen.

(PCR-Gruppen-Zugehörigkeit nach PCR-Ergebnis mit T3B-Primer, ETBF oder NTBF entsprechend der PCR-Ergebnisse der spezifischen PCR: Razeq: Primer RS-3 und RS-4 nach Shetab R et al., 1998, Kato: Primer GBF 101 und GBF 110 nach Kato N et al., 1996, MP: Primer LO I und RO I nach Moncrief JS et al., 1998, 1100bp-Primer: P1T3 und P1T3-1, 1300bp-Primer: P1T7 und P1T7-1, 1600bp-Primer: P1T7 und P1T3 nach Franco AA et al., 1999).

Stamm-Nr	PCR-Gruppe	ETBF	Razeq	Kato	MP	1100	1300	1600
6253	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
6293	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6299	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
6332	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
6404	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
6408	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
6465	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6492	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6530	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
6535	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
6538	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6667	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6687	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6690	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
6697	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
6704	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
6712	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Stamm-Nr	PCR-Gruppe	ETBF	Razeq	Kato	MP	1100	1300	1600
6974	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
7124	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7153	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7375	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
7517	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
7527	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7562	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
7565	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7735	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
7751	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
7799	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
7800	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
7869	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
7874	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
7875	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
2393	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
5081	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
5138	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5328	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
5447	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
5521	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
5732	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5813	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5835	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
5861	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5874	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5912	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5935	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
6016	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
6017	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6470	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg

Stamm-Nr	PCR-Gruppe	ETBF	Razeq	Kato	MP	1100	1300	1600
6791	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
6792	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7135	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
7187	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
8709	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
8717	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
8771	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
8769	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
9376	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
9545	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
9546	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
10085	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
10137	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
10184	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
10641	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BK 6782	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BK 6785	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BK 3431a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
BK 9677	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
BK 9897	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
BK 9999	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
BK 11085	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos

4.4.5 Nicht-Blutkulturen

Von insgesamt 260 klinischen Isolaten waren 190 Nicht-Blutkulturisolate. Auch diesmal wurden mittels der Primerpaare RS-3/4, GBF101/110 und LO1/RO1 20 (10.5%) ETBF und 170 (89.5%) NTBF Stämme identifiziert. Zwölf Stämme (6.3%) konnten der PCR Gruppe II zugeordnet werden, das heißt, 93.7% der Stämme (n=178) gehörten zur PCR Gruppe I. Die 20 ETBF Isolate waren ausnahmslos der PCR Gruppe I zugehörig.

Tab. 13: Verteilung ETBF, NTBF und Flanking Region sowie der PCR-Gruppe I und II in Nicht-Blutkultur-Isolaten.

Stämme	NichtBlutkulturen	Prozent (%)
Gesamtzahl Stämme	190	100
PCR Gruppe I	178	93.7
PCR Gruppe II	12	6.3
ETBF	20	10.5
NTBF	170	89.5
1600 pos	88	46.3
1600 neg	102	53.7

Das 1600bp Fragment der Flanking Region besaßen 86 der 170 NTBF und zwei Stämme der ETBF Isolate. Von den 86 NTBF Isolaten gehörten drei Stämme der PCR-Gruppe II an, alle anderen gehörten der PCR Gruppe I an. Bei den 20 ETBF Stämmen wurde das 1600bp Fragment nur zweimal (Stamm-Nr. 6720 und 5691) nachgewiesen (s. Tab. 9, S. 49, und Tab. 14, S. 54). Diese sind die einzigen von 260 *B. fragilis* Stämmen, bei welchen sowohl ETBF als auch das 1600bp Fragment gleichzeitig nachgewiesen wurde. Sie gehörten wie alle ETBF der PCR Gruppe I an (Tab. 14).

Tab. 14: Verteilung ETBF, NTBF und Flanking Regions innerhalb der PCR-Gruppe II in Nicht-Blutkultur-Isolaten.

Stämme	Nicht-Blutkulturen N=190 (NTBF 170, ETBF 20)	Nicht-Blutkulturen PCR Gruppe II N=12 (NTBF)
NTBF, 1600 pos	86	3
NTBF, 1600 neg	84	9
ETBF, 1600 pos	2	/
ETBF, 1600 neg	18	/

Tab. 15: Darstellung der einzelnen PCR Ergebnisse für die Nicht-Blutkulturen.

(PCR-Gruppen-Zugehörigkeit nach PCR-Ergebnis mit T3B-Primer, ETBF oder NTBF entsprechend der PCR-Ergebnisse der spezifischen PCR: Razeq: Primer RS-3 und RS-4 nach Shetab R et al., 1998, Kato: Primer GBF 101 und GBF 110 nach Kato N et al., 1996, MP: Primer LO I und RO I nach Moncrief JS et al., 1998, 1100bp-Primer: PIT3 und PIT3-1, 1300bp-Primer: PIT7 und PIT7-1, 1600bp-Primer: PIT7 und PIT3 nach Franco AA et al., 1999).

Stamm-Nr	PCR-Gruppe	ETBF	Razeq	Kato	MP	1100	1300	1600
VA 16081b	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 16233a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 18116	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 18539a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 19192c	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
VA 19527a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 19627/28a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
TP 2731	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 19965a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 19965b	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 20273a	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
VA 20434a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 21992d	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
VA 21993b	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
VA 215b	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
VA 1187	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 1391	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 1833	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 1984a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 2131d	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 2484b	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 3042	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 3117a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 3638c	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 3761	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 5276a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos

Stamm-Nr	PCR-Gruppe	ETBF	Razeq	Kato	MP	1100	1300	1600
VA 5613	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 5448a	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
VA 6772a	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
VA 6808b	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
VA 7171c	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 6993a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 6791a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 7360b	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 5748	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 8122a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 9034a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 9100a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 9337a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 9756a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 9804a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 9966a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 10308a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 10998a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 11384	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
VA 11701	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 11711	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 12512	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 12631a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 12753d	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 12851a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 13305a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 14251	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 14345d	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 14833b	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Stamm-Nr	PCR-Gruppe	ETBF	Razeq	Kato	MP	1100	1300	1600
VA 14834c	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 15120a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 15188a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 15189a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 15357a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 16085	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 16648a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 18190a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 19112a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 19369a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 19432a	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
VA 19506a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 21609c	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 21666b	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 21825	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
VA 21839a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 22028a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 22315c	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 22740a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 22815a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 23180	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 23501b	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 23560/1	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 23931	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 24089c	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 1300a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 2153	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 2246a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 2424b	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos

Stamm-Nr	PCR-Gruppe	ETBF	Razeq	Kato	MP	1100	1300	1600
VA 3090	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 3332	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 3472b	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 4177c	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 5136a	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
VA 5261a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 5505	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 5928a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 6140a	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
VA 6175a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VA 6184a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VA 6332a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VK 1404	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VK 1286a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VK 1491	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VK 1492	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VK 1511/1	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VK 4232	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VK 4971/1	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
VK 5942/1	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
VK 399	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
309	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5120	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
5691	I	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos
5735	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
5771	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
5798	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
5875	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
5876	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Stamm-Nr	PCR-Gruppe	ETBF	Razeq	Kato	MP	1100	1300	1600
6363	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6557	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6600	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6706	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
6720	I	pos	pos	pos	neg	neg	neg	pos
6730	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
6790	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
6793	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
7006	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
USC 607	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
6	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
10	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
17	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
172	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
174	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
175	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
180	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
187	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
189	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
197	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
199	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
200	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
210	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
221	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
243	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
244	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
245	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
246	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
247	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

Stamm-Nr	PCR-Gruppe	ETBF	Razeq	Kato	MP	1100	1300	1600
248	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
249	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
251	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
252-1	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
253	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
272	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
275	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
276	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
277	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
278	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
281	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
287	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
296	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
297	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
298	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
308	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
309	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
310	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
313	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
315	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
316	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
317	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
320	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
323	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
328	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
333	I	pos	pos	pos	pos	pos	pos	neg
337	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
338	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
343	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos

Stamm-Nr	PCR-Gruppe	ETBF	Razeq	Kato	MP	1100	1300	1600
354	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
Berlin 7302-1	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
b	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
c	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
e	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
f	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
g	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
h	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
i	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
j	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
k	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
m	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
n	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
o	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
Jena	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
Richter II a	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Bremen 2085	I	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos
basp München	II	neg	neg	neg	neg	neg	neg	pos

4.4.6 Statistik zum Vergleich des Vorkommens der ETBF-Gen-Sequenzen und flankierenden Regionen (flanking regions) bei Blutkultur-Isolaten gegenüber Nicht- Blutkulturisolaten

Zum Vergleich des Vorkommens der ETBF-Gen-Sequenzen und flankierenden Regionen aus Blutkulturen und Nicht-Blutkulturen wurde eine Statistik durchgeführt. Eine Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden. Die in der unten stehenden Tabelle angegebenen Daten wurden mittels Chi² Test geprüft (Tab. 16).

Tab. 16: Statistische Auswertung des Verhältnisses von ETBF zu NTBF bei Blutkulturen und Nicht-Blutkulturen mittels Chi² Test.

Stämme	Blutkulturen	Prozent (%)	Nicht-Blutkulturen	Prozent (%)	Gesamt	Prozent (%)	p-Wert Chi ²
Gesamtzahl Stämme	70	100	190	100	260	100	/
PCR-Gruppe I	63	90	178	93.7	241	92.7	0.311
PCR-Gruppe II	7	10	12	6.3	19	7.3	
ETBF positiv	12	17.1%	20	10.5%	32	12.3%	0.150
ETBF negativ	58	82.9%	170	89.5%	228	87.7%	
1600 pos	28	40%	88	46.3%	116	44.6%	0.363
1600 neg	42	60%	102	53.7%	144	55.4%	

4.4.7 Ausschluß von Enterotoxin-Genen bei *Bacteroides vulgatus* und *Bacteroides ovatus*

Diese Untersuchungen der Spezies *B. vulgatus* und *B. ovatus*, welche als Negativ-Kontrollen im Vergleich zum Schwerpunkt dieser Arbeit, dem Nachweis von ETBF bei der Spezies *B. fragilis*, benutzt wurden, erbrachten ein homogenes Resultat. Die zehn mittels spezifischer PCR nach Shetab R et al., 1998 und Kato N et al., 1996 untersuchten Stämme war Enterotoxin-Gen negativ (Tab. 17). Damit konnte gezeigt werden, dass diese Enterotoxinbildung ein Merkmal der Spezies *B. fragilis*, nicht jedoch der Spezies *B. vulgatus* bzw. *B. ovatus* darstellt. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass mit den eingesetzten Methoden für *B. fragilis* spezifische genetische Unterschiede nachgewiesen wurden.

Tab. 17: Darstellung der Kontrollstämme *B. vulgatus* und *B. ovatus*, welche die BfPAI nicht enthalten.

(ETBF oder NTBF entsprechend der PCR-Ergebnisse der spezifischen Primer: Razeq: Primer RS-3 und RS-4 nach Shetab R, et al., 1998, Kato: Primer GBF 101 und GBF 110 nach Kato N et al., 1996, MP: Primer LO I und RO I nach Moncrief JS et al., 1998).

Stamm-Nr	ETBF	Razeq	Kato
1999	neg	neg	neg
1997	neg	neg	neg
295	neg	neg	neg
5361	neg	neg	neg
5475	neg	neg	neg
5736	neg	neg	neg
5315	neg	neg	neg
5351	neg	neg	neg
6506	neg	neg	neg
6529	neg	neg	neg

4.4.8 Vergleich der *Bacteroides fragilis* Stämme nach geographischer Herkunft

Die sowohl in den USA also auch in Deutschland gesammelten Stämme wurden bezüglich ihrer Herkunft verglichen (s. Tab. 18), um Rückschlüsse hinsichtlich geographischer Unterschiede und Gemeinsamkeiten ziehen zu können. Zu bemerken ist, dass es sich bei den amerikanischen Stämmen hauptsächlich um Blutkulturen handelte. Wir fanden bei den amerikanischen Stämmen prozentual eine höhere Anzahl von ETBF Stämmen und eine höhere Anzahl von Gruppe II Stämmen. Bei den deutschen Isolaten überwogen prozentual die Pattern III Stämme.

Tab. 18: Vergleich der deutschen und amerikanischen *B. fragilis* Stämme bzgl. des Vorhandenseins von ETBF, Gruppe II sowie Pattern III.

	Anzahl dt. Stämme (N=179)	Anzahl US Stämme (N=81)
ETBF	16 (8.9%)	16 (19.8%)
Gruppe II	10 (5.6%)	9 (11.1%)
NTBF Pattern III	85 (47.5%)	31 (38.3%)

4.5 Sequenzierung der BfPAI-flankierenden Regionen in ausgewählten Stämmen

4.5.1 Sequenzierung der flankierenden Regionen

Die flankierenden Elemente von sechs Stämmen mit spezifischen Charakteristika, einschließlich von drei ETBF (Pattern I), einem NTBF (Pattern III) Isolaten und der beiden Referenzstämmen ATCC 25285 (*B. fragilis* Typstamm, Pattern III) und ATCC 43859 (Referenzstamm, ETBF) wurden für die Sequenzierung ausgewählt, um Ähnlichkeiten oder Differenzen zu finden (Tab. 19).

Die vier klinischen Isolate stammten aus Blutkulturen. Ihre Sequenzen wurden untereinander sowie mit der Sequenz des Stammes 86-5443-2-2 verglichen (Franco AA et al., 1999). Es wurden Punktmutationen in Fragment T7-T71 in den NTBF Pattern III Stämmen 3431 (Blutkultur NTBF, Gruppe I, 1600pos) und ATCC 25285 nachgewiesen (Abb. 17, S. 66). Außerdem wurde bei dem ETBF Stamm 6974 (Blutkultur, ETBF, Gruppe I, Pattern I) in dem Element T71-T7 der Austausch von vier Nucleotiden gefunden (Abb. 18, S. 66). Weiterhin wurden sowohl eine Punktmutation in dem Fragment T3-T31 des Stammes 3431 und des Stammes ATCC 25285 (NTBF, Pattern III) im Vergleich mit den ETBF Stämmen als auch ein größerer Nucleotid Austausch bei zwei klinischen ETBF Isolaten 10085 und 6974 wurde nachgewiesen (Abb. 19, S.67).

Tab. 19: Übersicht über die sequenzierten Stämme unter Angabe der verwendeten Primer und der NCBI Blast Accession Numbers (Claros MC et al., 2006).

^a Blutkulturisolat, intraabdominelle Infektion. Das Isolat war Carbapenem sensibel (MHK <0.06). In derselben Probe wurde *Bacteroides thetaiotaomicron* nachgewiesen. ^b Keine klinische Information vorhanden. ^c Männlicher Patient, Chirurgische Abteilung, pAVK mit Sepsis nach Amputation, zusätzlich Pneumonie.

Accession Numbers	Stamm Nummer	DNA-Fragment	Herkunft
AJ 850062	10085	T31-T3	R.M. Alden Research Lab ^a
AJ 850066		T3-T31	
AJ 850072		T71-T7	
AJ 850076		T7-T71	
AJ 850065	7869	T31-T3	Loyola Universität ^b
AJ 850071		T3-T31	
AJ 850075		T71-T7	
AJ 850080		T7-T71	
AJ850064	6974	T31-T3	Loyola Universität ^b
AJ 850070		T3-T31	
AJ 850074		T71-T7	
AJ 850081		T7-T71	
AJ 850068	3431	T3-T31	Leipzig Universität ^c
AJ 850078		T7-T71	
AJ 850063	43859	T31-T3	ATCC
AJ 850069		T3-T31	
AJ 850073		T71-T7	
AJ 850079		T7-T71	
AJ 850067	25285	T3-T31	ATCC
AJ 850077		T7-T71	

10085	ACTGTCAAGAATCATATAGACAACAACCACAGAACCCCTGAAAAGCAACGATGACAAATTC
43859	ACTGTCAAGAATCATATAGACAACAACCACAGAACCCCTGAAAAGCAACGATGACAAATTC
25285	ACTGTCAAGAATCATATAGACAACAACCACAGGACCCTGAAAAGCAACGATGACAAATTC
3431	ACTGTCAAGAATCATATAGACAACAACCACAGGACCCTGAAAAGCAAGGATGACAAATTC
86-5443-2-2	ACTGTCAAGAATCATATAGACAACAACCACAGAACCCCTGAAAAGCAACGATGACAAATTC
10085	TATATGCTTTCCATCAATCCCAGCGGTGACGAACAGAGACATCTGATAGAAAGGGTGACC
43859	TATATGCTTTCCATCAATCCCAGCGGTGACGAACAGAGACATCTGATAGAAAGGGTGACC
25285	TATATGCTTTCCATCAATCCCAGCGTTGACGAACAGAGACATCTGATAGAAAGGGTGACC
3431	TATATGCTTTCCATCAATCCCAGCGTTGACGAACAGAGACATCTGATAGAAAGGGTGACC
86-5443-2-2	TATATGCTTTCCATCAATCCCAGCGGTGACGAACAGAGACATCTGATAGAAAGGGTGACC

Abb. 17: Die Sequenzanalyse des flankierenden Elements der NTB-F-Stämme für ATCC 25285 (*B. fragilis* Typstamm) sowie 3431 (klinischer Stamm aus Blut), nachgewiesen mit dem Primerpaar T7 und T7-1, zeigte Punktmutationen in Positionen 33 und 86. Sie wurden mit den ETBF-Stämmen ATCC 43859 (*B. fragilis* Typstamm) und 10085 (klinisches Isolat aus Blut) verglichen. Die Sequenzen wurden mit Sequenzen von Franco AA et al., 1999 verglichen.

10085	GACCTTGAAAGGAACGCAACAGCAATAAACACCCAGAACCTTCCTGTTTGAAGCAAAACC
43859	GACCTTGAAAGGAACGCAACAGCAATAAACACCCAGAACCTTCCTGTTTGAAGCAAAACC
6974	GACCTTGAAAGGAACGCAACAGCAATAAACACCCAGAACATCACTGTTTGAAGTAAAACC
7869	GACCTTGAAAGGAACGCAACAGCAATAAACACCCAGAACCTTCCTGTTTGAAGCAAAACC
86-5443-2-2	GACCTTGAAAGGAACGCAACAGCAATAAACACCCAGAACCTTCCTGTTTGAAGCAAAACC
10085	TCTCCACATATTCCCGTAGTCAGAGTAATGCTGCACTTCGTAATCCATATGTAATACTTC
43859	TCTCCACATATTCCCGTAGTCAGAGGAATGCTGCACTTCGTAATCCATATGTAATACTTC
6974	TCTCCACATACTCCCGTAGTCAGAGGAATGCTGCACTTCGTAATCCATATGTAATACTTC
7869	TCTCCACATATTCCCGTAGTCAGAGTAATGCTGCACTTCGTAATCCATATGTAATACTTC
86-5443-2-2	TCTCCACATATTCCCGTAGTCAGAGTAATGCTGCACTTCGTAATCCATATGTAATACTTC

Abb. 18: Teilsequenz des klinischen Isolates 6974 (ETBF, Blutkulturstamm), sequenziert mittels Primerpaar T7-1 und T7. Es wurden Unterschiede in den Nucleotiden 86 – 100 und 117 gefunden. Das Alignement wurde im Vergleich zu einer Sequenz von Franco AA et al., 1999 durchgeführt. Bei Stamm 7869 handelt es sich ebenfalls um einen ETBF-Stamm aus einer Blutkultur.

10085	GCGAATACAAGGTCGGCTTTGTGCTGCTTACACAGTCCGGTTCAAAACTGGAGAATCTGT
6974	GCGAATACAAGGTCGGCTTTGTGCTGCTTACACAGTCCGGTTCAAAACTGGAGAATCTGT
43859	GCGAATACAAGGTCGGCTTTGTGCTGCTTACACAGTCCGGCGCAAAACTGGAAGCCCTGT
7869	GCGAATACAAGGTCGGCTTTGTGCTGCTTACACAGTCCGGCGCAAAACTGGAAGCCCTGT
25285	GCGAATACAAGGTCGGCTTTGTGCTGCTTACACAGTCCGGCGCAAAACTGGAAGCCCTGT
3431	GCGAATACAAGGTCGGCTTTGTGCTGCTTACACAGTCCGGCGCAAAACTGGAAGCCCTGT
86-5443-2-2	GCGAATACAAGGTCGGCTTTGTGCTGCTTACACAGTCCGGCGCAAAACTGGAAGCCCTGT
10085	ATGGCAAGCTCGACCGGTCTCCGTGGAAGCCAATTTTCGGAATCCAGTTCTTCGGGCGTA
6974	ATGGCAAGCTCGACCGGTCTCCGTGGAAGCCAATTTTCGGAATCCAGTTCTTCGGGCGTA
43859	ATGGTAAACTCGACCGGGCTCCGTGGAAGCCAATTTTCGGAATCCAGTTCTTCGGGCGTA
7869	ATGGTAAACTCGACCGGGCTCCGTGGAAGCCAATTTTCGGAATCCAGTTCTTCGGGCGTA
25285	ATGGTAAACTCGACCGGTCTCCGTGGAAGCCAATTTTCGGAATCCAGTTCTTCGGACGTA
3431	ATGGTAAACTCGACCGGTCTCCGTGGAAGCCAATTTTCGGAATCCAGTTCTTCGGACGTA
86-5443-2-2	ATGGTAAACTCGACCGGTCTCCGTGGAAGCCAATTTTCGGAATCCAGTTCTTCGGACGTA

Abb. 19: Die Sequenzanalyse zeigte Mutationen (in den Fragmenten nachgewiesen mit T3 und T3-1) der NTBF-Stämme des Pattern III im Vergleich zu den ETBF-Stämmen (Pattern I) (Position 296) und einen größeren Nucleotid-Austausch bei den Stämmen 10085 und 6974 (Positionen 42-43 und 54-58). Die Sequenzen wurden mit der von Franco AA et al., 1999 eingestellten Sequenz verglichen.

5 Diskussion

Die humane Physiologie benötigt das Mikrobiom mit dem Hauptbestandteil der anaeroben Flora zur Unterstützung der Ernährung und Entgiftung. Speziell der Darm ist als am meisten besiedeltes Organ des menschlichen Körpers im Fokus: er enthält bis zu 10^{11} Bakterien/g Stuhl (Costello EK et al., 2009). Das intestinale Mikrobiom umfasst nach derzeitigen Erkenntnissen 500–1000 Spezies. Die Flora setzt sich aus den beiden wichtigsten anaeroben Phyla, *Bacteroidetes* und *Firmicutes*, zusammen (Turnbaugh PJ et al., 2007); innerhalb des *Bacteroidetes* Phylums stellten *Bacteroides* spp. ungefähr 25% der kultivierten Gesamtflora dar (Salyers AA, 1984). Untersucht wurde hier die Typspezies des Genus *Bacteroides*, *B. fragilis*, welche einerseits mit 1–2% der kultivierten Darmbakterien als Kommensale eine relativ geringe Rolle spielt (Finegold SM, 1969). Andererseits hat *B. fragilis* sowohl mit der Eigenschaft, als potentes opportunistisches Pathogen endogene Infektionen hervorrufen zu können sowie als Exotoxin-Bildner an Bedeutung gewonnen (Myers LL et al., 1985). Klinische Studien (Snydman DR et al., 2017) sowie die Untersuchungen zur Bildung von *B. fragilis* Toxin (Fragilysin) (persönliche Kommunikation Tang YJ, 2014) ließen *B. fragilis* als interessantes Studienobjekt erscheinen. Schwerpunkte der hier vorgenommenen Untersuchungen an 265 klinischen Isolaten der Spezies *B. fragilis* waren:

Auswahl der Teststämme. Basierend auf umfangreichen phänotypischen und molekularen Untersuchungen an *B. fragilis* von Johnson JL, 1978, welche zeigten, dass die Methode der Stamm-Selektion großen Einfluss auf die Heterogenität oder Homogenität der Stammeigenschaften hatte, wurde eine umfangreiche Sammlung klinischer Isolate angelegt. Spezielles Augenmerk lag auf der Sammlung von Blutkulturoisolen aus verschiedenen Laboratorien, da deren klinische Bedeutung von anderen Gruppen (Nguyen MH et al., 2000) mit einer Letalität von 16% beschrieben wurde. De Keukeleire S et al. beschrieben 2016 in einer 10-Jahres retrospektiven Studie, dass die Spezies

B. fragilis am häufigsten (106 von 437 anaeroben Isolaten) aus Blutkulturen isoliert wurde. Bei diversen Patienten, deren Proben untersucht wurden, lag eine schwere Infektion vor. Hier wurde davon ausgegangen, dass Blutkultur-isolate spezielle Virulenz-Faktoren besaßen, welche sie befähigten, eine Sepsis hervorzurufen.

Phänotypen. Voraussetzung für die umfassende Charakterisierung der Stämme sowie die Gruppierung der Isolate innerhalb der Spezies war eine korrekte Spezies-Identifizierung mit phänotypischen Methoden. Galle-resistente klinische Isolate, zuvor in den unterschiedlichen Laboratorien mit Schnelltests und/oder konventionellen biochemischen Methoden identifiziert, wurden einer wiederholten phänotypischen Testung unterzogen. Ausgewählt wurden Isolate mit typischer Koloniemorphologie auf CBA nach 48-stündigem Wachstum. Die Kolonien waren in ihrer Erscheinung klein, grau, glänzend und rund wie im Wadsworth KTL-Manual beschrieben (Jousimies-Somer H., 2002). Die Bakterienzellen, zur Reinheitskontrolle auf BBE gebracht, zeigten Wachstum und damit Galle-Resistenz und wurden stäbchenförmig (typisch) im Gram-präparat dargestellt. Die zur weiteren Differenzierung eingesetzten Reaktionen, Kanamycin (resistent), Colistin (resistent) und Vancomycin (resistent), Nitrat (negativ), fielen typisch aus (Citron DM et al., 1990). Die Katalase Reaktion war schwach bis sehr stark positiv und damit ebenfalls typisch. Alle Stämme erschienen mittels der jeweils zwei unterschiedlichen Indol-Tests negativ. Die Indol-Reaktion wurde als wichtige Schlüsselreaktion zur Differenzierung von *Bacteroides* Spezies betrachtet, daher wurde ein negatives Testergebnis mehrfach überprüft, um eine falsche Einteilung in die Indol-positive Gruppe der *Bacteroides* spp. zu verhindern (Citron DM et al., 1990).

In den 1990er Jahren entwickelten Citron DM et al. aus wenigen PRAS-Kohlenhydrat-Fermentations-Reaktionen in Kombination mit diversen Schnelltests ein Identifikationsschema für *B. fragilis*. Diese Methoden wurden im Wadsworth-KTL Manual (Jousimies-Somer H., 2002) zusammengefasst. Die

Stämme, welche für diese Arbeit vom RMA bezogen wurden, waren dort mittels der im Wadsworth-KTL-Manual beschriebenen Techniken prä-identifiziert worden. In dieser Arbeit wurde entschieden, Testkits für den Nachweis von in der Zelle präformierten Enzymen, welche sowohl Glycosidase- und Peptidase-Substrate enthielten, wie RapID ANA II (Oxoid GmbH, D) und API 32A (BioMérieux, F), einzusetzen. Das Rapid 32A (BioMérieux, Frankreich) enthielt neben präformierten Enzymen und Kohlenhydratfermentationstest weitere biochemische Reaktionen. Diese Testkits konnten direkt mit dem vom Blutagar gewonnenen frischen (aktiven) Kulturen beimpft und nach vier- bis sechsstündiger aerober Inkubation abgelesen werden.

Es wurden 261 Stämme der Spezies *B. fragilis* zugeordnet. Jeweils fünf weitere Stämme aus den Spezies *B. ovatus* bzw. *B. vulgatus* wurden zu Vergleichszwecken untersucht. *B. vulgatus* Isolate dienten hierbei zum Ausschluss von überlappenden Eigenschaften zwischen den beiden Indol-negativen Spezies. *B. ovatus* Stämme wurden ebenfalls einbezogen, um eine Fehlidentifizierung auszuschließen.

Tab. 20: Gruppierung gramnegativer anaerober Stäbchen unter Nutzung von Schnelltests. (modifiziert nach Citron DM, 2012)

Abkürzungen: Kana – Kanamycin 1000µg disk; Van – Vancomycin 5µg disk; Col – Colistin 10µg Disk. Bile – 20% Galle Disk; Cat – Katalase; Nit – Nitrat Reduktion; Ind – Spot Indol.

^a Tier-Spezies, welche z.B. aus Bisswunden isoliert wurden, sind Katalase positiv.

^b Die Identifikation klinischer Spezies kann durch die Nutzung von Schnelltests erfolgen (Warren YA et al., 2005).

Gruppe	Kana	Van	Col	Bile	Cat	Nit	Ind
<i>Bacteroides</i> spp.	R	R	R	R	+ ⁻	-	V
<i>Prevotella</i> spp.	R	R	V	S	-	-	-
<i>Porphyromonas</i> spp.	R	S	R	S	- ^{+a}	-	+ ⁻
<i>Fusobacterium</i> spp.	S	R	S	V	-	-	+ ⁻
<i>Bilophila wadsworthia</i>	S	R	S	R	+	+	-
<i>Desulfovibrio</i> spp. ^b	S	R	R	V	V	V	V
<i>Campylobacter</i> spp.	S	R	S	-	- ⁺	+	-

Molekulare Methoden. Durch die Kombination kultureller und molekularer Methoden wurde in den 1960 bis 1970er Jahren die taxonomische Grundlage innerhalb des Genus *Bacteroides* gelegt (Finegold SM, 1969). Der Einsatz unterschiedlichster PCR- und Sequenzierungsmethoden zur Identifizierung von Anaerobiern (Arumugam M et al., 2011), speziell die 16S rDNA-Sequenzierung, hat die Anaerobier-Bakteriologie vollkommen verändert: Innerhalb des Genus *Bacteroides* wurden mehr als zehn Spezies neu beschrieben, andere Spezies wurden aufgrund molekularer Charakterisierung z.B. als *Parabacteroides* spp. (z.B. *Bacteroides distasonis*: neu *Parabacteroides distasonis*) re-klassifiziert (Paster BJ et al., 1994). Allerdings wiesen neue Spezies-Beschreibungen häufig Defizite auf, da ihre Beschreibung ausschließlich durch die Sequenzierung der 16S rDNA bei wenigen klinischen Isolaten erfolgte (und damit die Heterogenität innerhalb der Spezies unberücksichtigt blieb) sowie nur einige phänotypische Merkmale beschrieben wurden. Demzufolge entsprachen diese Beschreibungen nicht den geforderten Anforderungen an die Charakterisierung neuer Spezies (Citron DM, 2012).

PCR Fingerprinting. Bei den phänotypischen Untersuchungen wurden anfänglich bei den *B. fragilis* Isolaten nur minimale Schwankungen in den Reaktionsausfällen festgestellt. Von Citron DM, 2012, wurde beschrieben, dass phänotypische Methoden zur Charakterisierung der Spezies nicht ausreichten, demzufolge wurden zur Bestätigung der phänotypischen Identifizierung PCR-Fingerprint-Tests zur korrekten Spezies- und Gruppen-Identifizierung durchgeführt. Untersuchungen mit Einzelprimern, die Spezies- und Gruppen-spezifische Profile (5–15 Banden) produziert hatten, wurden von anderen Gruppen (Welsh J & McClelland M, 1991) eingesetzt. Hier wurde der tDNA-Primer T3B als Einzelprimer in Vortests ausgewählt. Die Durchführung der PCR erfolgte zur Sicherung vergleichbarer Ergebnisse unter stringenten Bedingungen nach der Optimierung der PCR Bedingungen nach Cobb BD & Clarkson JM, 1994. Diese mathematische Optimierungs-

Methode wurde eingesetzt, um robuste PCR-Tests zu entwickeln. Sie berücksichtigte die Effekte und Interaktionen bestimmter Reaktions-Komponenten gleichzeitig mittels einer kleinen Anzahl von Tests. So wurde der Aufwand sehr aufwendiger experimenteller Voruntersuchungen minimiert und in wenigen Tests die Konzentrationen, die die Stabilität der Reaktionsprodukte positiv beeinflussten, gefunden. Weiterhin wurden die Größe und Verteilung der Reaktionsprodukte hinsichtlich einer guten Bewertbarkeit beeinflusst.

Mit Hilfe der Resultate der PCR-Fingerprint-Analysen wurden im Vergleich mit den Referenzstämmen ATCC 25285 und VPI 2393 anhand Spezies-spezifischer Banden 260 von 261 Stämmen der Spezies *B. fragilis* zugeordnet. Ein Stamm, VA215a, der in den phänotypischen Untersuchungen eindeutig als *B. fragilis* identifiziert wurde, wies die speziesspezifischen Banden nicht auf und wurde daher aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Jeweils fünf Stämme der Spezies *B. vulgatus* und *B. ovatus* zeigten diese Banden erwartungsgemäß ebenfalls nicht.

Charakterisierung der Spezies und Einteilung in zwei PCR-Gruppen. Mittels des T3B Primers wurden im Vergleich der Profile des Typstammes ATCC 25285 mit dem Profil des durch das VPI zur Verfügung gestellten Referenzstammes VPI 2393 (Johnson JL, 1978) (DNA Homologie-Gruppe II) zwei PCR-Gruppen unterschieden. Die biochemischen Profile beider Gruppen sahen mit kleineren Varianten einheitlich aus. Das Profil der PCR Gruppe I entsprach dem Profil des *B. fragilis* Typstammes ATCC 25285; beschrieben bei 241 von 260 Stämmen (Tab. 7, S. 46). Das Profil der PCR Gruppe II entsprach dem Profil des von Johnson JL, 1978, bei DNA-Homologie-Untersuchungen beschriebenen Stammes VPI 2393, welcher als separate molekulare Gruppe mittels der DNA Homologie-Untersuchungen etabliert sowie von Johnson JL & Harich B, 1986 mit RNA Homologie-Untersuchungen bestätigt wurde. 19 von 260 (7.3%, s. Tab. 6, S. 43) Stämmen gehörten der Gruppe II an. Im Vergleich

zu Gewebsisolaten zeigten die Blutkulturisolate (n=7, 10%, s. Tab. 10, S. 50) von Gruppe II Stämmen (n=12, 6.3% Nichtblutkulturisolate) einen deutlich höheren Anteil an Gruppe II Stämmen (s. Tab. 13, S. 54). Diese Ergebnisse waren mit denen von Johnson JL, 1978, sowie Johnson JL & Ault DA, 1978, und Johnson JL & Harich B, 1986, vergleichbar. Allerdings fanden diese Autoren (Johnson JL & Harich B, 1978 und 1986) keine phänotypischen Merkmale, welche unterschiedlichen molekularen Gruppen der Spezies *B. fragilis* zugeordnet werden konnten. Hinweise auf phänotypische Unterschiede zwischen beiden molekularen *B. fragilis*-Gruppen wurden in der Routine-Diagnostik durch auffällige MHK-Werte von Beta-Lactam-Antibiotika bei den Stämmen der Gruppen II gefunden. Es wurde gezeigt, dass bei 3/179 Stämmen MHK-Werte die als intermediär bzw. dass 3/179 Stämmen als resistent gegen Imipenem (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019) zu bewerten waren (Rodloff AC, 2010, mündliche Kommunikation). Appelbaum PC et al. zeigten 1986 anhand einer sehr kleinen Stammzahl den Zusammenhang zwischen der von Johnson 1978 beschriebenen DNA-Homologie-Gruppe II und einer Zunahme von Resistenzen von *B. fragilis* gegenüber Beta-Lactam-Antibiotika. Entsprechend der Untersuchungen von Podglajen I et al., 1995, wurde davon ausgegangen, dass in diesen Stämmen eine chromosomal determinierte Metallo-Beta-Lactamase vorliegt, welche in unterschiedlichem Maße exprimiert wird. Edwards & Greenwood beschrieben, dass *B. fragilis* Stämme mit phänotypischen Carbapenem-Resistenzen Veränderungen der Außenmembranproteine aufwiesen (Edwards R & Greenwood D, 1997). Diese Unterschiede in der Permeabilitäts-Barriere könnten auf einen separaten Phänotyp innerhalb der Spezies hindeuten.

Bacteroides fragilis als Enterotoxinbildner. *B. fragilis* wurde Mitte der 1980er Jahre als Exotoxinbildner identifiziert. Speziell die Produktion des als Enterotoxin identifizierten Fragilysins, (Wick EC & Sears CL, 2010), das in vitro zu

einer Modifikation humaner Krebszelllinien (HT29/C1) sowie zur Flüssigkeits-Akkumulation in intestinalen tierischen Darmschlingen führte, galt als entscheidende neue Eigenschaft. Als Target des *B. fragilis* Toxins (BFT) wurde ein zelluläres Oberflächenprotein, das E-Cadherin nachgewiesen. Dieses galt als grundsätzlicher Bestandteil der Zonula Adherens, welche der Zell-Zell Adhäsion dient. Sears CL beschrieb 2009 eine grundlegende Übereinstimmung des BFT im Protein-Alignment der Domäne BFT-2 mit der Proteinstruktur des Accessory Cholera Enterotoxins von *Vibrio cholerae* (Ace), des *Escherichia coli* hitzestabilen Enterotoxins (STb) und der des *Staphylococcus aureus* Delta Toxins. Enterotoxin-produzierende *B. fragilis* (ETBF) gewannen eine größere Bedeutung als Erreger, die für Fälle schwerer Infektionen mit septischem Verlauf verantwortlich zeichnen (Sears CL, 2009).

Tab. 21: Unterteilung von molekularen Subtypen von *B. fragilis* und ihre Bedeutung im menschlichen Körper. Modifiziert nach Sears CL, 2012.

<i>Bacteroides fragilis</i>	
Nicht Enterotoxin bildende <i>B. fragilis</i> NTBF	Enterotoxigene <i>B. fragilis</i> ETBF
Unterstützt die Mukosa (Förderung der Gesundheit)	Inflammatorische Diarrhoe Asymptomatische Kolonisation
„Gut“	„Schlecht“

Durch den PCR-Nachweis molekularer Strukturen, wie der *bft*-und *mplI*-Gen-Fragmente, wurden zwei Subtypen von *B. fragilis* unterschieden: Stämme welche die Pathogenitätsinsel trugen – ETBF – und Stämme, die die Pathogenitätsinsel nicht trugen – NTBF. Wie Moncrief JS et al., 1998, zeigten, entstanden ETBF Stämme durch den Transfer einer fremden 6-kb Region, der BfPAI, welche die Toxin-codierenden Gene trug. Das Vorkommen der *bft*-und *mplI*-Gene wurde durch PCR-Nachweis dreier unterschiedlicher Sequenzen mit verschiedenen spezifischen Primern (RS-3, RS-4 (Shetab R et al., 1998), GBF 101, GBF 110 (Kato N et al., 1996) sowie MP I, MP II (Moncrief JS et al.,

1998) für das *bft*- und einen Nachweis der *mpll*-Fragmente untersucht. Es wurde gezeigt, dass 32 von 260 Isolaten (12.3%, s. Tab. 7, S. 46) ETBF waren. Franco AA et al. beschrieben 1999, dass es sich bei den *bft*- und *mpll*-Genen um Sequenzen handelte, die aus einer fremden Quelle akquiriert wurden. Bei Vorhandensein des *bft*-Genes bildeten die ETBF-Stämme Fragilysin (Franco AA et al., 1999). Daher wurde davon ausgegangen, dass die Erreger, in deren DNA die *bft*- und *mpll*-Gene nachgewiesen wurden, eine höhere Virulenz als die NTBF Isolate (die diese Gene nicht trugen) aufwiesen. Franco AA et al. zeigten 1999, dass ein weiteres Rekombinations-Event stattgefunden hatte, welches die Toxinbildung von *B. fragilis* Stämmen beeinflusst hatte. Neben der BfPAI traten weitere Elemente in der Gesamtlänge von 12kb auf rechts und links der BfPAI auf. Teile dieser 12kb langen flankierenden DNA wurden interessanterweise ebenfalls in NTBF Stämmen gefunden, welche *bft* nicht aufwiesen. Das Vorhandensein der flankierenden Sequenzen wirkte sich auf die optimale Toxinbildung aus.

Bei der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, dass *B. fragilis* Gruppe II Stämme nie ETBF positiv waren. Sie besaßen jedoch teilweise die flankierenden Elemente (NTBF Pattern III). In den Vergleichsstämmen der Spezies *B. ovatus* und *B. vulgatus* wurden keine Bestandteile der Pathogenitätsinsel gefunden.

Unterschiede zwischen BK- und NBK-Isolaten. Bei der Auswertung der PCR-Ergebnisse zu den *bft*- und *mpll*-Fragmenten (lokalisiert auf der BfPAI) wurde gezeigt, dass 12 von 70 (17.1%) der Blutkulturisolate ETBF waren. Hingegen konnten bei Nicht-Blutkulturisolaten in 20 von 190 Stämmen (10.5%) ETBF nachgewiesen werden. Statistisch handelte es sich um eine nicht-signifikante Erhöhung der Zahlen (nachgewiesen im χ^2 -Test; s. Tab. 16, S. 62) im Vergleich von Blutkulturen zu Nicht-Blutkulturisolaten. Da es sich bei allen BK-Isolaten um Stämme schwer kranker Patienten handelte, wurde trotz dieses Ergebnisses weiterhin davon ausgegangen, dass es Unterschiede

hinsichtlich der Virulenz innerhalb der Isolate, wie auch bei Nguyen MH et al., 2000, gab. Da die Akquise der BK-Isolate sehr aufwendig war, wurde in dieser Arbeit davon ausgegangen, dass zum Nachweis eines signifikant höheren Auftretens von ETBF eine noch größere Zahl von Isolaten nötig gewesen wäre.

Im Fokus der weiteren Untersuchungen stand die molekulare Ausstattung von Nicht-BK versus BK-Isolaten bei Vorhandensein der BfPAI (ETBF-Isolaten, Pattern I) und nicht-Vorhandensein der BfPAI (NTBF Isolaten mit flankierenden Elementen, Pattern III). Franco et al. hatten 2002 festgestellt, dass sowohl die BfPAI als auch die flankierenden DNA-Regionen für die *bft*-Expression wichtig sind (Franco AA et al., 2002). Hier wurde gezeigt, dass von allen untersuchten Stämmen 114 von 228 (50%) NTBF eine zusätzliche 12kb flankierende DNA-Region trugen; sie gehörten zu Pattern III (s. Tab. 8, S. 48). Die andere Hälfte der NTBF war Pattern II. Bei den Blutkulturisolaten waren 28 von 58 (48.3%), NTBF Stämmen 1600bp positiv (Pattern III) (s. Tab. 10 und Tab. 11, S. 50 und 51). Hingegen wurden bei den NBK bei 86 von 170 NTBF das 1600bp Fragment (50.6%) (Pattern III) gefunden (s. Tab. 13 und Tab. 14, S. 54). Der prozentuale Anteil der Stämme, die ETBF (Pattern I) plus NTBF Pattern III sind und somit das 1600bp Fragment besitzen, wich bei den Blutkulturen und den Nicht-Blutkulturen (40 von 70 BK (57%) vs. 106 von 190 (55.7%) nicht voneinander ab. Dies entspricht den Ergebnissen von Franco AA et al., 1999. Es lässt sich hinsichtlich des Vorhandenseins des 12kb-Elements keine besondere genetische Ausstattung der Blutkulturisolate ableiten (s. Tab. 11, S. 51, und Tab. 14, S. 54 im Ergebnisteil).

Es wurde gefunden, dass 2 von 20 (10%) ETBF Stämmen das 1600bp Fragment besaßen. Die Stämme 6720 und 5691 sind ETBF, die neben der BfPAI ebenfalls das 1600bp Fragment besaßen. Beide Stämme waren negativ für *mplI* und wiesen auch die 1100bp und 1300bp Fragmente nicht auf. Die Annahme ist, dass es sich hier um eine genetische Variante handelt.

Geographische Unterschiede zwischen den *B. fragilis* Stämmen. Im Gegensatz zu den Erkenntnissen des Vergleichs BK vs. NBK ließen sich wie auch bei Shetab R et al., 1998 zwischen den amerikanischen und deutschen Stämmen Unterschiede feststellen. Die amerikanischen Isolate, die zumeist aus BK stammten, zeigten prozentual mehr ETBF und Gruppe II Stämme. 19.8% bzw. 11.1% der US Stämme waren ETBF bzw. Gruppe II Stämme im Gegensatz zu 8.9% bzw. 5.6% der deutschen Stämme. Bei den deutschen Stämmen zeigten sich mehr NTBF Pattern III Stämme (47.5% vs. 38.3%) (s. Tab. 18, S. 64).

Sequenzierung. Teile dieser 1600bp Fragmente dreier ETBF Isolate (Pattern I, eines NTBF-Isolates (Pattern III) und der Referenzstämmen ATCC 25285 (NTBF, Pattern III) sowie ATCC 43859 (ETBF, Pattern I) wurden sequenziert und mit der Sequenz des ETBF Stammes (ETBF 86-5443-2-2, AF038459, Franco AA et al., 1999) verglichen. Der Vergleich erfolgte mittels NCBI Blast Server (Altschul SF et al., 1997). Es fanden sich verschiedene Punktmutationen in dem Fragment T7-T71 bei den NTBF Pattern III Stämmen 3431 und ATCC 25285. Außerdem wurden innerhalb des flankierenden Elementes T71-T7 des ETBF Stammes 6974 vier Nucleotid-Austausche gefunden. Eine Punkt-Mutation trat in dem Fragment T3-T31 der Stämme 3431 und ATCC 25285 auf. Ein größerer Basenaustausch fand bei den beiden klinischen ETBF Isolaten 10085 und 6974 statt. Interessanterweise wurde eine Akkumulation von Punktmutationen in dem ETBF Stamm 6974 lokalisiert; hier kann die Hypothese aufgestellt werden, dass es zu einem Austausch der daraus resultierenden Aminosäuresequenz kam.

Herkunft der BfPAI. Eine Hypothese von Franco AA et al., 1999, zur Erklärung der Entstehung unterschiedlicher ETBF (Pattern I) bzw. NTBF Pattern II und III war, dass es sich bei den 6-kb und 12-kb flankierenden Regionen um mobile Elemente handeln könnte. Diese verbreiteten sich unterschiedlich, z.B. Pattern II NTBF Stämme akquirierten durch horizontalen Gentransfer flankierende Elemente, welche Mobilisierungs-Gene enthielten und somit

Pattern III NTBF wurden. Die BfPAI könnte in diese Pattern III Stämme integriert worden sein; es entstanden ETBF. Alternativ könnten die BfPAI und die flankierenden Regionen als komplettes Element eingefügt worden sein. Diese Hypothese wurde von Franco und Mitarbeitern durch die Tatsache bestätigt, dass NTBF Pattern III öfter in Regionen vorkamen, in denen ETBF mit höherer Frequenz nachgewiesen wurden als in geographischen Regionen, in denen ETBF seltener auftraten. Diese geographischen Unterschiede konnten in unseren Ergebnissen nicht dargestellt werden. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die Mechanismen zum Transfer der BfPAI aufzuklären.

6 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel:

Nachweis von enterotoxigenen *Bacteroides fragilis* Stämmen aus klinischen Materialien und molekulare Charakterisierung der *Bacteroides fragilis* Pathogenitätsinsel

eingereicht von: Zaida Corinna Claros

angefertigt an:

der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie

Direktor: Prof. Dr. med. Arne C. Rodloff

betreut von: Prof. Dr. med. Arne C. Rodloff

eingereicht: Mai 2020

B. fragilis wird mit klinischen Bildern mit wie Abdominal- und Weichgewebs-Infektionen sowie Sepsis-Geschehen assoziiert, weitere Krankheitsbilder sind noch in der Erforschung. In der Vergangenheit gaben Virulenzfaktoren wie die komplexe Kohlehydrat-Kapsel, das Endotoxin sowie die Produktion von Katalase und Hämagglutinin nur eine unzureichende Erklärung für die Entstehung schwerer Infektionen, die der Keim auch als Einzelerreger verursachte. In den 1980er Jahren wurden Enterotoxigene *B. fragilis* Stämme als Erreger akuter Diarrhoe bei Kindern festgestellt; nachfolgend wurden Stämme mit diesem Virulenzfaktor in den unterschiedlichsten Infektionsgeschehen nachgewiesen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Enterotoxin-Bildung von *Bacteroides fragilis* Stämmen eine Rolle bei der Pathogenese von systemischen Infektionen sowie möglicherweise bei der Entstehung von Darmkrebs spielt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde/n

1. Eine umfangreiche Stammsammlung von 271 *Bacteroides fragilis* Stämmen unterschiedlicher geographischer Herkunft aus den USA (Stammsammlungen) und aus Deutschland sowie verschiedener klinischer Herkunft (insbesondere n=70 Blutkulturisolate) zusammengestellt.
2. Die Überprüfung der Spezies-Identifizierung mittels phänotypischer Reaktionen (Koloniemorphologie, biochemische Methoden) sowie nachfolgender molekularer Tests (PCR-Fingerprinting) führte zum Ausschluss eines Isolates.
3. Mit molekularen Methoden die PCR-Gruppen I und II charakterisiert, wobei die meisten Stämme der Gruppe I angehörten.
4. Der molekulare Nachweis von Enterotoxin-Genabschnitten mit Rückschluss auf das Vorhandensein der BfPAI bei 32 von 260 Stämmen (12.3%) geführt. Diese Stämme waren immer Teil der PCR Gruppe I. Die 260 untersuchten Stämme konnten in Pattern I, II oder III eingeteilt werden.
5. Blutkultur-Stämme und Stämme aus anderen Quellen (Nicht-Blutkulturen) verglichen. Es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Vorkommens von ETBF sowie NTBF Pattern III dargestellt werden.
6. In den US-amerikanischen Stämmen prozentual mehr ETBF und Gruppe II Stämme als in deutschen Isolaten nachgewiesen.
7. Beim Vergleich der Sequenzen die BfPAI flankierender Elemente sechs ausgewählter Stämme, einschließlich der Referenzstämme (ATCC 25285, NTBF Pattern II; ATCC 43859, ETBF Pattern I) verschiedene Punktmutationen gefunden.

7 Literaturverzeichnis

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(17): 3389–3402.

Appelbaum PC, Jacobs MR, Spangler SK et al. Comparative Activity of Beta-Lactamase Inhibitors YTR 830, Clavulanate, and Sulbactam Combined with Beta-Lactams against Beta-Lactamase-Producing Anaerobes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986; 30(5): 789–791.

Arumugam M, Raes J, Pelletier E et al. Enterotypes of the Human Gut Microbiome. *Nature.* 2011; 473(7346): 174–180.

Balk RA, Bone RC. The Septic Syndrome. Definition and Clinical Implications. *Crit Care Clin.* 1989; 5(1): 1–8.

Balows A, Trüper HG, Dworkin M et al. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. Springer Science & Business Media; New York 1992.

Bartlett JG, Onderdonk AB, Louie T et al. A Review. Lessons from an Animal Model of Intra-Abdominal Sepsis. *Arch Surg Chic Ill.* 1978; 113(7): 853–857.

Bennion RS, Baron EJ, Thompson JE et al. The Bacteriology of Gangrenous and Perforated Appendicitis–Revisited. *Ann Surg.* 1990; 211(2): 165–171.

Bergan T. Pathogenicity of Anaerobic Bacteria. *Scand J Gastroenterol Suppl.* 1984; 91: 1–11.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology – Vol. 1: J. G. Holt und N. R. Krieg (Hrsg.), Seite 1–964; Vol. 2: J. G. Holt, P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe (Hrsg.), Seite 965–1599; Williams & Wilkins, Baltimore 1984.

Boleij A, Hechenbleikner EM, Goodwin AC et al. The *Bacteroides fragilis* Toxin Gene Is Prevalent in the Colon Mucosa of Colorectal Cancer Patients. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 2015; 60(2): 208–215.

Bone RC. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Critical Care Medicine*. 1992;20: 864–874.

Breuil J, Dublanche A, Truffaut N et al. Transferable 5–Nitroimidazole Resistance in the *Bacteroides fragilis* Group. *Plasmid*. 1989; 21(2): 151–154.

Bridson EY, Oxoid Ltd. *The Oxoid Manual*. Eighth Ed. Basingstoke: Oxoid; 1998.

Brook I, Frazier EH. Aerobic and Anaerobic Microbiology in Intra–Abdominal Infections Associated with Diverticulitis. *J Med Microbiol*. 2000; 49(9): 827–830.

Brook I, Frazier EH. Microbiology of Subphrenic Abscesses: A 14–year Experience. *Am Surg*. 1999; 65(11): 1049–1053.

Brook I, Wexler HM, Goldstein EJC. Antianaerobic Antimicrobials: Spectrum and Susceptibility Testing. *Clin Microbiol Rev*. 2013; 26(3): 526–546.

Brook I. The Role of Anaerobic Bacteria in Bacteremia. *Anaerobe*. 2010; 16(3): 183–189.

Cáceres M, Zhang G, Weintraub A et al. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Children with Diarrhoea in Nicaragua. *Anaerobe*. 2000; 6(3): 143–148.

Cato EP, Johnson JL. „Reinstatement of Species Rank for *Bacteroides fragilis*, *B. ovatus*, *B. distasonis*, *B. thetaiotaomicron*, and *B. vulgatus*: Designation of Neotype Strains for *Bacteroides fragilis* (Veillon and Zuber) Castellani and Chalmers and *Bacteroides thetaiotaomicron* (Distaso) Castellani and Chalmers“. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1976; 26(2): 230–237.

Cerdeño–Tárraga AM, Patrick S, Crossman LC et al. Extensive DNA Inversions in the *B. fragilis* Genome Control Variable Gene Expression. *Science*. 2005;307(5714): 1463–1465.

Chambers FG, Koshy SS, Saidi RF et al. *Bacteroides fragilis* Toxin Exhibits Polar Activity on Monolayers of Human Intestinal Epithelial Cells (T84 cells) in vitro. *Infect Immun*. 1997; 65(9): 3561–3570.

Choi VM, Herrou J, Hecht AL et al. Activation of *Bacteroides fragilis* Toxin by a Novel Bacterial Protease Contributes to Anaerobic Sepsis in Mice. *Nat Med.* 2016; 22(5): 563–567.

Citron DM, Baron EJ, Finegold SM et al. Short Prereduced Anaerobically Sterilized (PRAS) Biochemical Scheme for Identification of Clinical Isolates of Bile-resistant *Bacteroides* species. *J Clin Microbiol.* 1990; 28(10): 2220–2223.

Citron DM. Pre-Molecular Identification – Ignorance was Bliss? *Anaerobe.* 2012; 18(2): 189–191.

Claros MC, Claros ZC, Tang YJ et al. Occurrence of *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Gene-Carrying Strains in Germany and the United States. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(5): 1996–1997.

Claros MC, Claros ZC, Hecht DW et al. Characterization of the *Bacteroides fragilis* Pathogenicity Island in Human Blood Culture Isolates. *Anaerobe.* 2006; 12(1): 17–22.

Cobb BD, Clarkson JM. A Simple Procedure for Optimizing the Polymerase Chain Reaction (PCR) Using Modified Taguchi Methods. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(18): 3801–3805.

Costello EK, Lauber CL, Hamady M et al. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science.* 2009; 326(5960): 1694–1697.

D’Abusco AS, Del Grosso M, Censini S et al. The Alleles of the *bft* Gene Are Distributed Differently among Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Strains from Human Sources and Can Be Present in Double Copies. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(2): 607–612.

De Keukeleire S, Wybo I, Naessens A et al. Anaerobic Bacteraemia: A 10-year Retrospective Epidemiological Survey. *Anaerobe.* 2016; 39: 54–59.

Delahooke DM, Barclay GR, Poxton IR. Tumor Necrosis Factor Induction by an Aqueous Phenol-extracted Lipopolysaccharide Complex from *Bacteroides* species. *Infect Immun.* 1995; 63(3): 840–846.

Dellinger RP, Schorr CA, Levy MM. A Users’ Guide to the 2016 Surviving Sepsis Guidelines. *Intensive Care Med.* 2017; 43(3): 299–303.

Donelli G, Fabbri A, Fiorentini C. *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Induces Cytoskeletal Changes and Surface Blebbing in HT-29 Cells. Infect Immun. 1996; 64(1): 113–119.

Dorsher CW, Rosenblatt JE, Wilson WR et al. Anaerobic Bacteremia: Decreasing Rate over a 15-Year Period. Rev Infect Dis. 1991; 13(4): 633–636.

Edenhofer F, Famulok M. PCR. Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion. Herausgegeben von H. G. Gassen, G. E. Sachse und A. Schulte. G. Fischer, Stuttgart, 1994.

Edwards R, Greenwood D. Distinctive Outer Membrane Protein and Lipopolysaccharide Composition of *Bacteroides fragilis* Strains that Produce Metallo-Beta-Lactamase. Anaerobe 1997; 3: 233–236.

Fang H, Edlund C, Hedberg M et al. New findings in Beta-Lactam and Metronidazole Resistant *Bacteroides fragilis* Group. Int J Antimicrob Agents. 2002; 19(5): 361–370.

Finegold SM, George WL, Mulligan ME. Anaerobic Infections. Part I. Dis Mon DM. 1985; 31(10): 1–77.

Finegold SM, George WL, eds. Anaerobic Infections in Humans. Academic Press, San Diego, 1989: 137–149.

Finegold SM. Anaerobic Gram-Negative Bacilli. In: Baron S, Ed., Medical Microbiology. 4th Ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

Finegold SM. Intestinal Bacteria – The Role They Play in Normal Physiology, Pathologic Physiology, and Infection. Calif Med. 1969; 110(6): 455–459.

Franco AA, Cheng RK, Chung G-T et al. Molecular Evolution of the Pathogenicity Island of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Strains. J Bacteriol. 1999; 181(21): 6623–6633.

Franco AA, Cheng RK, Goodman A et al. Modulation of *bft* Expression by the *Bacteroides fragilis* Pathogenicity Island and its Flanking Region. Mol Microbiol. 2002; 45(4): 1067–1077.

Fraser AG, Brown R. Neuraminidase Production by *Bacteroidaceae*. J Med Microbiol. 1981; 14(1): 63–76.

Gassen HG, Sachse GE, Schulte A. PCR Grundlagen und Anwendung der Polymerase-Ketten-Reaktion, Gustav-Fischer-Verlag. Stuttgart 1994. s.Edenhofer F und Famulok M.

Goldstein EJC. Anaerobes under Assault: From Cottage Industry to Industrialization of Medicine and Microbiology. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1995; 20 Suppl 2: S112–116.

Gül F, Arslantaş MK, Cinel İ et al. Changing Definitions of Sepsis. Turk J Anaesthesiol Reanim. 2017; 45(3): 129–138.

Hacker J, Blum-Oehler G, Mühldorfer I et al. Pathogenicity Islands of Virulent Bacteria: Structure, Function and Impact on Microbial Evolution. Mol Microbiol. 1997; 23(6): 1089–1097.

Hastey CJ, Boyd H, Schuetz AN et al. Changes in the Antibiotic Susceptibility of Anaerobic Bacteria from 2007–2009 to 2010–2012 based on the CLSI Methodology. Anaerobe. 2016; 42: 27–30.

Herrou J, Choi VM, Bubeck Wardenburg J et al. Activation Mechanism of the *Bacteroides fragilis* Cysteine Peptidase, Fragipain. Biochemistry. 2016; 55(29): 4077–4084.

Holdeman LV, Cato EP, Moore WE. Taxonomy of Anaerobes: Present State of the Art. Rev Infect Dis. 1984; 6 Suppl 1: 3–10.

Holdeman LV, Kelley RW, Moore WEC. Anaerobic Gramnegative, Straight, Curved and Helical Rods. In: Krieg NR and Holt JG, Eds., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD, 1984, pp. 602–662. S. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

Ingham HR, Slekon JB, Roxby CM. Bacteriological Study of Otogenic Cerebral Abscesses: Chemotherapeutic Role of Metronidazole. Br Med J. 1977; 2(6093): 991–993.

James PA, Al-Shafi KM. Clinical Value of Anaerobic Blood Culture: A Retrospective Analysis of Positive Patient Episodes. J Clin Pathol. 2000; 53(3): 231–233.

- Johnson JL.** Taxonomy of the *Bacteroides* I. Deoxyribonucleic Acid Homologies among *Bacteroides fragilis* and Other Saccharolytic *Bacteroides* species. Int J System Bacteriol. 1978;28(2): 245–256.
- Johnson JL, Ault DA.** Taxonomy of the *Bacteroides*: II. Correlation of Phenotypic Characteristics with Deoxyribonucleic Acid Homology Groupings for *Bacteroides fragilis* and Other Saccharolytic *Bacteroides* Species. Int J Syst Bacteriol. 1978;28(2): 257–268.
- Johnson JL, Harich B.** Ribosomal Ribonucleic Acid Homology among Species of the Genus *Bacteroides*. Int J Syst Evol Microbiol. 1986; 36(1): 71–79.
- Jousimies-Somer H. Wadsworth-KTL Anaerobic Bacteriology Manual. Sixth Ed.** Star Pub, Korea, 2002.
- Kalka-Moll WM, Wang Y, Comstock LE et al.** Immunochemical and Biological Characterization of Three Capsular Polysaccharides from a Single *Bacteroides fragilis* Strain. Infect Immun. 2001; 69(4): 2339–2344.
- Karas M, Bachmann D, Hillenkamp F.** Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. Anal Chem. 1985; 57(14): 2935–2939.
- Kato N, Kato H, Watanabe K et al.** Association of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with Bacteremia. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1996; 23 Suppl 1: S83–86.
- Kato N, Liu CX, Kato H et al.** Prevalence of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Children with Diarrhea in Japan. J Clin Microbiol. 1999; 37(3): 801–803.
- Kato N, Liu CX, Kato H et al.** A New Subtype of the Metalloprotease Toxin Gene and the Incidence of the three *bft* Subtypes among *Bacteroides fragilis* Isolates in Japan. FEMS Microbiol Lett. 2000; 182(1): 171–176.
- Kay BA, Rahman R, Sack D et al.** *Bacteroides fragilis* as a Potential Cause of Human Diarrheal Disease in Bangladesh. In: Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas, Sack RB, Zinnaka Y (eds.). Vol.7. KTK Scientific publishers, Tokyo, 1990: 269–276.

Kitch TT, Appelbaum PC. Accuracy and Reproducibility of the 4-hour ATB 32A Method for Anaerobe Identification. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(11): 2509–2513.

Koshy SS, Montrose MH, Sears CL. Human Intestinal Epithelial Cells Swell and Demonstrate Actin Rearrangement in Response to the Metalloprotease Toxin of *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun.* 1996; 64(12): 5022–5028.

Lee CA. Pathogenicity Islands and the Evolution of Bacterial Pathogens. *Infect Agents Dis.* 1996; 5(1): 1–7.

Leszczynski P, van Belkum A, Pituch H et al. Vaginal Carriage of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Pregnant Women. *J Clin Microbiol.* 1997; 35(11): 2899–2903.

McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS et al. A Genetic Locus of Enterocyte Effacement Conserved among Diverse Enterobacterial Pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(5): 1664–1668.

Menozzi MG, Malpeli M, Covan S et al. *Bacteroides fragilis* Diarrhea in Children Admitted to Parma University Hospital: A Case–Control Study. In: 2nd World Congress on Anaerobic Bacteria and Infections (abstract), Nizza, 1998.

Merino VRC, Nakano V, Liu C et al. Quantitative Detection of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* Subtypes Isolated from Children with and without Diarrhea. *J Clin Microbiol.* 2011; 49(1): 416–418.

Moncrief JS, Duncan AJ, Wright RL et al. Molecular Characterization of the Fragilysin Pathogenicity Islet of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Infect Immun.* 1998; 66(4): 1735–1739.

Moncrief JS, Obiso RJ Jr, Barroso LA et al. The Enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a Metalloprotease. *Infect Immun.* 1995; 63(1): 175–181.

Moore WE, Holdeman LV. Human fecal flora: The Normal Flora of 20 Japanese–Hawaiians. *Appl Microbiol.* 1974; 27(5): 961–979.

Myers LL, Firehammer BD, Shoop DS et al. *Bacteroides fragilis*: A Possible Cause of Acute Diarrheal Disease in Newborn Lambs. Infect Immun. 1984; 44(2): 241–244.

Myers LL, Shoop DS, Collins JE et al. Diarrheal Disease Caused by Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Infant Rabbits. J Clin Microbiol. 1989; 27(9): 2025–2030.

Myers LL, Shoop DS, Firehammer BD et al. Association of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with Diarrheal Disease in Calves. J Infect Dis. 1985; 152(6): 1344–1347.

Myers LL, Shoop DS, Stackhouse LL et al. Isolation of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from Humans with Diarrhea. J Clin Microbiol. 1987; 25(12): 2330–2333.

Myers LL, Shoop DS. Association of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* with Diarrheal Disease in Young Pigs. Am J Vet Res. 1987; 48(5): 774–775.

Myers LL, Shoop DS, Byars TD. Diarrhea Associated with Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Foals. Am J Vet Res. 1987;48(11): 1565–1567.

Nguyen MH, Yu VL, Morris AJ et al. Antimicrobial Resistance and Clinical Outcome of *Bacteroides* Bacteremia: Findings of a Multicenter Prospective Observational Trial. Clin Infect Dis. 2000; 30(6): 870–876.

Obiso RJ Jr, Azghani AO, Wilkins TD. The *Bacteroides fragilis* Toxin Fragilysin Disrupts the Paracellular Barrier of Epithelial Cells. Infect Immun. 1997; 65(4): 1431–1439.

Obiso RJ Jr, Lysterly DM, Van Tassell RL et al. Proteolytic Activity of the *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Causes Fluid Secretion and Intestinal Damage in vivo. Infect Immun. 1995; 63(10): 3820–3826.

Obiso, RJ Jr, Bevan DR, Wilkins TD. Molecular Modeling and Analysis of Fragilysin, the *Bacteroides fragilis* Toxin. Clin Infect Dis. 1997; 25: 153–155.

Oh H, Edlund C. Mechanism of Quinolone Resistance in Anaerobic Bacteria. Clin Microbiol Infect. 2003; 9(6): 512–517.

Onderdonk AB, Cisneros RL, Finberg R et al. Animal Model System for Studying Virulence of and Host Response to *Bacteroides fragilis*. Rev Infect Dis. 1990; 12 (2): 169–177.

Pantosti A, Menozzi MG, Frate A et al. Detection of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* and its Toxin in Stool Samples from Adults and Children in Italy. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1997; 24(1): 12–16.

Paster BJ, Dewhirst FE, Olsen I et al. Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas spp.* and Related Bacteria. J Bacteriol. 1994; 176(3): 725–732.

Podglajen I, Breuil J, Casin I et al. Genotypic Identification of two Groups within the Species *Bacteroides fragilis* by Ribotyping and by Analysis of PCR-generated Fragment Patterns and Insertion Sequence Content. J Bacteriol. 1995; 177(18): 5270–5275.

Polk BF, Kasper DL. *Bacteroides fragilis* Subspecies in Clinical Isolates. Ann Intern Med. 1977; 86(5): 569–571.

Purcell RV, Pearson J, Aitchison A et al. Colonization with Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* is Associated with Early-Stage Colorectal Neoplasia. PLoS ONE. 2017; 12(2): e0171602.

Redondo MC, Arbo MD, Grindlinger J et al. Attributable Mortality of Bacteremia Associated with the *Bacteroides fragilis* Group. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1995; 20(6): 1492–1496.

Reid G. When Microbe Meets Human. Clin Infect Dis. 2004; 39(6): 827–830.

Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. Intensive Care Med. 2017; 43(3): 304–377.

Rocha ER, Smith CJ. Biochemical and Genetic Analyses of a Catalase from the Anaerobic Bacterium *Bacteroides fragilis*. J Bacteriol. 1995; 177(11): 3111–3119.

Rodloff AC, Hahn H. Synergistic Lethality in Experimental Infections with *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis*. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]. 1984; 258(1): 112–119.

Rodloff AC. Mechanismen der Synergistischen Pathogenität von *Bacteroides fragilis* in Mischinfektionen. Habilitationsschrift, Freie Universität Berlin. 1987.

Rodloff AC. Persönliche Kommunikation, Leipzig, 2010.

Rodríguez-Sánchez B, Alcalá L, Marín M et al. Evaluation of MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) for Routine Identification of Anaerobic Bacteria. *Anaerobe*. 2016; 42(Supplement C): 101–107.

Rudek W, Haque RU. Extracellular Enzymes of the Genus *Bacteroides*. *J Clin Microbiol*. 1976; 4(5): 458–460.

Sack RB, Albert MJ, Alam K et al. Isolation of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* from Bangladeshi Children with Diarrhea: A Controlled Study. *J Clin Microbiol*. 1994; 32(4): 960–963.

Sack RB, Myers LL, Almeida-Hill J et al. Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: Epidemiologic Studies of its Role as a Human Diarrhoeal Pathogen. *J Diarrhoeal Dis Res*. 1992; 10(1): 4–9.

Saidi RF, Jaeger K, Montrose MH et al. *Bacteroides fragilis* Toxin Rearranges the Actin Cytoskeleton of HT29/C1 Cells without Direct Proteolysis of Actin or Decrease in F-Actin Content. *Cell Motil Cytoskeleton*. 1997; 37(2): 159–165.

Saidi RF, Sears CL. *Bacteroides fragilis* Toxin Rapidly Intoxicates Human Intestinal Epithelial Cells (HT29/C1) in vitro. *Infect Immun*. 1996; 64(12): 5029–5034.

Sakamoto M, Tanaka Y, Benno Y et al. *Parabacteroides faecis* sp. nov., Isolated from Human Faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015; 65(Pt 4): 1342–1346.

Salyers AA. *Bacteroides* of the Human Lower Intestinal Tract. *Annu Rev Microbiol*. 1984; 38(1): 293–313.

San Joaquin VH, Griffis JC, Lee C et al. Association of *Bacteroides fragilis* with Childhood Diarrhea. *Scand J Infect Dis*. 1995; 27(3): 211–215.

- Sanfilippo L, Li CKF, Seth R et al.** *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Induces the Expression of IL-8 and Transforming Growth Factor- β by Human Colonic Epithelial Cells. Clin Exp Immunol. 2000; 119(3): 456–463.
- Sears CL, Kaper JB.** Enteric Bacterial Toxins: Mechanisms of Action and Linkage to Intestinal Secretion. Microbiol Rev. 1996; 60(1): 167–215.
- Sears CL, Myers LL, Lazenby A et al.** Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1995; 20 Suppl 2: 142–148.
- Sears, CL.** *Bacteroides fragilis* toxins. In: Alouf, JE, Freer, JH (eds.). The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, Second Ed., Academic Press, London, 1999: 557–566.
- Sears CL.** Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*: a Rogue among Symbiotes. Clin Microbiol Rev. 2009; 22(2): 349–369.
- Sears CL.** In Celebration of Sydney M Finegold, MD: *Bacteroides fragilis* in the Colon: The Good & the Bad. Anaerobe. 2012; 18(2): 192–196.
- Sears CL.** The Toxins of *Bacteroides fragilis*. Toxicon. 2001; 39(11): 1737–1746.
- Shah HN, Collins MD.** Proposal to Restrict the Genus *Bacteroides* (Castellani and Chalmers) to *Bacteroides fragilis* and Closely Related Species. Int J Syst Bacteriol. 1989; 39(1): 85–87.
- Shah HN.** The Genus *Bacteroides* and Related Taxa. In: The Prokaryotes. Springer, New York; 1992: 3593–3607.
- Shetab R, Cohen SH, Prindiville T et al.** Detection of *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Gene by PCR. J Clin Microbiol. 1998; 36(6): 1729–1732.
- Smith CJ.** What Constitutes an Extended-Spectrum β -lactamase? Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46(2): 600–601.
- Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA et al.** National Survey on the Susceptibility of *Bacteroides Fragilis* Group: Report and Analysis of Trends for 1997–2000. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2002;35 (1): 126–134.

Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA et al. National Survey on the Susceptibility of *Bacteroides fragilis* Group: Report and Analysis of Trends in the United States from 1997 to 2004. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(5): 1649–1655.

Snydman DR, Jacobus NV, McDermott LA et al. Trends in Antimicrobial Resistance among *Bacteroides* species and *Parabacteroides* species in the United States from 2010–2012 with Comparison to 2008–2009. Anaerobe. 2017; 43: 21–26.

Song Y, Liu CX, Lee J et al. „*Bacteroides goldsteinii* sp. nov.” Isolated from Clinical Specimens of Human Intestinal Origin. J Clin Microbiol. 2005; 43(9): 4522–4527.

Song YL, Liu CX, McTeague M et al. „*Bacteroides nordii*” sp. nov. and “*Bacteroides salyersae*” sp. nov. Isolated from Clinical Specimens of Human Intestinal Origin. J Clin Microbiol. 2004; 42(12): 5565–5570.

Sukumar M, Rizo J, Wall M et al. The Structure of *Escherichia coli* Heat-stable Enterotoxin b by Nuclear Magnetic Resonance and Circular Dichroism. Protein Sci Publ Protein Soc. 1995; 4(9): 1718–1729.

Swidsinski A, Weber J, Loening-Baucke V et al. Spatial Organization and Composition of the Mucosal Flora in Patients with Inflammatory Bowel Disease. J Clin Microbiol. 2005; 43(7): 3380–3389.

Tang YJ. Persönliche Kommunikation, Sacramento, 2006 und 2014.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 9.0, 2019. <http://www.eucast.org>.

Toprak NU, Yagci A, Gulluoglu BM et al. A Possible Role of *Bacteroides fragilis* Enterotoxin in the Aetiology of Colorectal Cancer. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2006; 12(8): 782–786.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M et al. The Human Microbiome Project: Exploring the Microbial Part of Ourselves in a Changing World. Nature. 2007; 449(7164): 804–810.

Tzianabos AO, Kasper DL, Cisneros RL et al. Polysaccharide-mediated Protection Against Abscess Formation in Experimental Intra-abdominal Sepsis. *J Clin Invest.* 1995; 96(6): 2727–2731.

Tzianabos AO, Kasper DL, Onderdonk AB. Structure and Function of *Bacteroides fragilis* Capsular Polysaccharides: Relationship to Induction and Prevention of Abscesses. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 1995; 20 (2): 132–140.

Vu Nguyen T, Le Van P, Le Huy C et al. Diarrhea Caused by Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Children less than 5 Years of Age in Hanoi, Vietnam. *Anaerobe.* 2005; 11: 109–114.

Warren YA, Citron DM, Merriam CV et al. Biochemical Differentiation and Comparison of *Desulfovibrio* Species and Other Phenotypically Similar Genera. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(8): 4041–4045.

Weikel CS, Grieco FD, Reuben J et al. Human Colonic Epithelial Cells, HT29/C1, Treated with Crude *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Dramatically Alter their Morphology. *Infect Immun.* 1992; 60(2): 321–327.

Wells CL, van de Westerloo EM, Jechorek RP et al. *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Modulates Epithelial Permeability and Bacterial Internalization by HT-29 Enterocytes. *Gastroenterology.* 1996; 110(5): 1429–1437.

Welsh J, McClelland M. Genomic Fingerprints Produced by PCR with Consensus tRNA Gene Primers. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19(4): 861–866.

Wexler HM, Finegold SM. Current Susceptibility Patterns of Anaerobic Bacteria. *Yonsei Med J.* 1998; 39(6): 495–501.

Wexler HM. *Bacteroides*: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(4): 593–621.

Wexler HM. Pump it up: Occurrence and Regulation of Multi-Drug Efflux Pumps in *Bacteroides fragilis*. *Anaerobe.* 2012; 18(2): 200–208.

Wick EC, Sears CL. *Bacteroides spp.* and Diarrhea. *Curr Opin Infect Dis.* 2010; 23(5): 470–474.

Zhang G, Svenungsson B, Kärnell A et al. Prevalence of Enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* in Adult Patients with Diarrhea and Healthy Controls. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 1999; 29(3): 590–594.

Zhao H, Heard SO, Mullen MT et al. An Evaluation of the Diagnostic Accuracy of the 1991 American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine and the 2001 Society of Critical Care Medicine/European Society of Intensive Care Medicine/American College of Chest Physicians/American Thoracic Society/Surgical Infection Society Sepsis Definition. Crit Care Med. 2012; 40(6): 1700–1706.

8 Anlagen

Tab. 22: Auflistung aller klinischen *B. fragilis* Stämme aus Blutkulturen (Isolationsort) unter Angabe von Herkunft und Stamm-Nummer.

Spezies	Stamm-Nummer	Isolationsort	Herkunft
<i>B. fragilis</i>	6253	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6293	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6299	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6332	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6404	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6408	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6465	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6492	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6530	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6535	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6538	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6667	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6687	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6690	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6697	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6704	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6712	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	6974	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	7124	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	7153	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	7375	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	7517	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	7527	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	7562	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	7565	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	7735	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	7751	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	7799	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	7800	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	7869	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	7874	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	7875	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	2393	Blut	LOY
<i>B. fragilis</i>	5081	Blut	RMA

Spezies	Stamm-Nummer	Isolationsort	Herkunft
<i>B. fragilis</i>	5138	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	5328	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	5447	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	5521	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	5732	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	5813	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	5835	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	5861	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	5874	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	5912	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	5935	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	6016	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	6017	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	6470	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	6791	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	6792	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	7135	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	7187	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	8709	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	8717	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	8771	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	8769	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	9376	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	9545	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	9546	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	10085	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	10137	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	10184	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	10641	Blut	RMA
<i>B. fragilis</i>	BK 6782	Blut	IML
<i>B. fragilis</i>	BK 6785	Blut	IML
<i>B. fragilis</i>	BK 3431a	Blut	IML
<i>B. fragilis</i>	BK 9677	Blut	IML
<i>B. fragilis</i>	BK 9897	Blut	IML
<i>B. fragilis</i>	BK 9999	Blut	IML
<i>B. fragilis</i>	BK 11085	Blut	IML

Tab. 23: Auflistung aller klinischen *B. fragilis* Stämme, die nicht aus Blutkulturen stammen unter Angabe von geographischer Herkunft, Stamm-Nummer sowie klinischem Isolationsort.

Spezies	Stamm-Nummer	Isolationsort	Herkunft
<i>B. fragilis</i>	VA 16081b	Perforierter App.	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 16233a	Gangrän	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 18116	Furunkel genitale	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 18539a	Pyodermie	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 19192c	Stumpf	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 19527a	Gen.fem.Abs.Spiral	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 19627/28a	Adnexitis	IML
<i>B. fragilis</i>	TP 2731	Diarrhoe	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 19965a	Embolektomie	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 19965b	Otitis media chron.	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 20273a	Otitis media chron.	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 20434a	Gewebe	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 21992d	Furunkel urogenitale	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 21993b	Abszeß	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 215a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 215b	Perf.Sigma-Divertik.	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 1187	Unguis incarnatus	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 1391	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 1833	Otitis media chron.	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 1984a	Unguis incarnatus	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 2131d	Ulz.Wunde	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 2484b	Thrombose Beinvene	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 3042	Akute Appendicitis	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 3117a	Perirektaler Abszeß	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 3638c	Abdomen	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 3761	Rez.Abs.Abd. HPV	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 5276a	Hämatom Kiefer	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 5613	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 5448a	Coccygeus-Abs.	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 6772a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 6808b	Periproktaler Absz.	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 7171c	Rektaler Abszeß	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 6993a	Otitis media acuta	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 6791a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 7360b	Periproktaler Absz.	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 5748	KA	IML

Spezies	Stamm-Nummer	Isolationsort	Herkunft
<i>B. fragilis</i>	VA 8122a	Infiz.Pankreaszyste	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 9034a	Diabet. Gangrän	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 9100a	Kolonperforation	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 9337a	Narbenabsz. App	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 9756a	Otitis media chron.	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 9804a	Otitis media chron.	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 9966a	Abszeß	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 10308a	Rez.Cholesteatom	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 10998a	Periproktaler Absz.	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 11384	Erysipel Unterschenkel	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 11701	Peritonitis	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 11711	Outer Ear	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 12512	Abdominal-Absz.	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 12631a	Retroperitoneal-abs	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 12753d	Radiusfraktur	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 12851a	Otitis media chron.	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 13305a	Intrauterine device	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 14251	Perirenaler Abszeß	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 14345d	Peniskarzinom	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 14833b	Herz-OP,atyp.Pneu	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 14834c	Herz-OP,atyp.Pneu	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 15120a	Nierenfreilegung	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 15188a	Diabetischer Fuß	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 15189a	Trauma left groin	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 15357a	Ulcus cruris (Diab.)	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 16085	Abortus imminens	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 16648a	Pankreaskarzinom	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 18190a	Sepsis (<i>Staph.aureus</i>)	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 19112a	Wunde	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 19369a	Wunde	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 19432a	Periproktaler Absz.	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 19506a	Hautläsion Fuß	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 21609c	sek.heilende Epi-Naht	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 21666b	Perf. Sigmadivertikulitis	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 21825	Wunde Abdomen	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 21839a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 22028a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 22315c	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 22740a	KA	IML

Spezies	Stamm-Nummer	Isolationsort	Herkunft
<i>B. fragilis</i>	VA 22815a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 23180	Cervix-Abstrich	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 23501b	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 23560/1	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 23931	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 24089c	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 1300a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 2153	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 2246a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 2424b	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 3090	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 3332	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 3472b	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 4177c	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 5136a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 5261a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 5505	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 5928a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 6140a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 6175a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 6184a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VA 6332a	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VK 1404	Perianaler Absz.	IML
<i>B. fragilis</i>	VK 1286a	Appendicitis	IML
<i>B. fragilis</i>	VK 1491	Perf. Appendix	IML
<i>B. fragilis</i>	VK 1492	Appendicitis	IML
<i>B. fragilis</i>	VK 1511/1	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	VK 4232	Appendix	IML
<i>B. fragilis</i>	VK 4971/1	Appendizitis	IML
<i>B. fragilis</i>	VK 5942/1	Cervix-Abstrich	IML
<i>B. fragilis</i>	VK 399	KA	IML
<i>B. fragilis</i>	BK 6782	Blut	IML
<i>B. fragilis</i>	BK 6785	Blut	IML
<i>B. fragilis</i>	BK 3431a	Blut	IML
<i>B. fragilis</i>	BK 9677	Blut	IML
<i>B. fragilis</i>	BK 9897	Blut	IML
<i>B. fragilis</i>	BK 9999	Blut	IML
<i>B. fragilis</i>	BK 11085	Blut	IML
<i>B. fragilis</i>	309	intraabdominal	RMA

Spezies	Stamm-Nummer	Isolationsort	Herkunft
<i>B. fragilis</i>	5120	Appendix	RMA
<i>B. fragilis</i>	5691	Tibia	RMA
<i>B. fragilis</i>	5735	Pelviner Abszeß	RMA
<i>B. fragilis</i>	5771	Appendix	RMA
<i>B. fragilis</i>	5798	Fuß Ulcus	RMA
<i>B. fragilis</i>	5875	Abdominal-Flüssigkeit	RMA
<i>B. fragilis</i>	5876	Gallenblase	RMA
<i>B. fragilis</i>	6363	KA	RMA
<i>B. fragilis</i>	6557	Peritonitis	RMA
<i>B. fragilis</i>	6600	Peritonitis	RMA
<i>B. fragilis</i>	6706	Peritonitis	RMA
<i>B. fragilis</i>	6720	Peritonitis	RMA
<i>B. fragilis</i>	6730	Peritonitis	RMA
<i>B. fragilis</i>	6790	Leiste	RMA
<i>B. fragilis</i>	6793	KA	RMA
<i>B. fragilis</i>	7006	KA	RMA
<i>B. fragilis</i>	USC 607	KA	RMA
<i>B. fragilis</i>	6	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	10	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	17	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	172	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	174	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	175	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	180	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	187	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	189	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	197	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	199	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	200	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	210	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	221	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	243	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	244	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	245	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	246	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	247	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	248	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	249	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	251	KA	IMB

Spezies	Stamm-Nummer	Isolationsort	Herkunft
<i>B. fragilis</i>	252-1	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	253	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	272	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	275	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	276	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	277	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	278	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	281	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	287	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	296	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	297	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	298	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	308	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	309	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	310	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	313	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	315	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	316	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	317	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	320	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	323	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	328	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	333	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	337	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	338	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	343	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	354	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	Berlin 7302-1	KA	IMB
<i>B. fragilis</i>	a	Colon CA	IMB
<i>B. fragilis</i>	b	Colon CA	IMB
<i>B. fragilis</i>	c	Colon CA	IMB
<i>B. fragilis</i>	e	Colon CA	IMB
<i>B. fragilis</i>	f	Colon CA	IMB
<i>B. fragilis</i>	g	Colon CA	IMB
<i>B. fragilis</i>	h	Colon CA	IMB
<i>B. fragilis</i>	i	Colon CA	IMB
<i>B. fragilis</i>	j	Colon CA	IMB
<i>B. fragilis</i>	k	Colon CA	IMB
<i>B. fragilis</i>	m	Colon CA	IMB

Spezies	Stamm-Nummer	Isolationsort	Herkunft
<i>B. fragilis</i>	n	Colon CA	IMB
<i>B. fragilis</i>	o	Colon CA	IMB
<i>B. fragilis</i>	Jena	KA	LRJ
<i>B. fragilis</i>	Richter II a	KA	Unbekannt
<i>B. fragilis</i>	Bremen 2085	KA	Unbekannt
<i>B. fragilis</i>	basp München	KA	LMU

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Arne C. Rodloff, Direktor des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie der Universität Leipzig, für die Überlassung des Themas und seine großzügige Unterstützung sowie seine Empfehlungen für meine Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes, insbesondere Frau Dr. Daniela Adler, die mich bei der Durchführung der Arbeit unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Ellie J.C. Goldstein, Herrn Emeritus Prof. Dr. Joseph Silva Jr. und Herrn Dr. David W. Hecht danke ich für das zur Verfügung stellen ihrer Labors bzw. Stämme. Herrn Prof. Dr. Joseph Silva Jr. danke ich außerdem für die großzügige Unterstützung meiner beruflichen Laufbahn.

Meinen lieben Freunden Frau Wiebke Eckert und Herrn Dr. Lavinus Ungur danke ich für die sorgfältigen Korrekturarbeiten.

Besonders bedanke ich mich für die Unterstützung und Inspiration durch meine Mutter PD Dr. Marina C. Claros.

10 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....
Datum

.....
Unterschrift

11 Publikationsliste

Artikel

Claros MC, **Claros ZC**, Tang JY, Silva J Jr, Goldstein EJC and Rodloff AC. Occurrence of *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Carrying Strains in Germany and United States. J. Clinical Microbiology 2000. 38, 1996–97.

Claros MC, **Claros ZC**, Hecht DW, Citron DM, Goldstein EJC, Silva J Jr, Tang-Feldman JY and Rodloff AC. Characterization of the *Bacteroides fragilis* Pathogenicity Island in Human Blood Culture Isolates. Anaerobe 2006. 12(1):17–22.

Poster

Claros MC, **Claros ZC**, Tang YJ, Silva J Jr, Goldstein EJC and Rodloff AC. Occurrence of *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Gene Carrying Strains (ETBF) in Germany and United States. 6th Scientific Meeting, European Society of Chemotherapy, May 20–22, 1999, Istanbul, Turkey.

Claros ZC, Claros MC, Tang YJ, Silva J Jr, Goldstein EJC and Rodloff AC. *Bacteroides fragilis* – an Important Anaerobic Pathogen. 6. Poster-Workshop. Methodische Entwicklungen in der mikrobiologischen Nukleinsäure-Diagnostik, 4.–5.Juni 1999, Berlin, Deutschland.

Claros ZC, Claros MC, Tang YJ, Citron DM, Silva J Jr, Goldstein EJC and Rodloff AC. Comparison of the Occurrence of *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Gene Carrying Strains. International Congress of the Confederation of Anaerobe Societies, July 10–12, 2000, Manchester, England.

Claros ZC, Claros MC und Rodloff AC. Der Nachweis von *Bacteroides fragilis* Enterotoxin Gen tragenden Stämmen aus unterschiedlichen Patientenmaterialien. 7. Poster-Workshop. Methodische Entwicklungen in der mikrobiologischen Nukleinsäure-Diagnostik, 30. Nov. – 2. Dez. 2000, Berlin, Germany.

Claros MC, **Claros ZC**, Hecht DW, Citron DM, Silva J Jr, Goldstein EJC and Rodloff AC. Characterization of the *Bacteroides fragilis* Pathogenicity Island in Blood Isolates. Swiss Society for Microbiology, March 6–7, 2003, Basel, Switzerland.